



# Approche dynamique de la coopération d'altérations génétiques dans la tumorigenèse corticosurrénalienne

Maryline Herbet

## ► To cite this version:

Maryline Herbet. Approche dynamique de la coopération d'altérations génétiques dans la tumorigenèse corticosurrénalienne. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00341959

**HAL Id: tel-00341959**

**<https://theses.hal.science/tel-00341959>**

Submitted on 26 Nov 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier – Grenoble 1  
École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

DOCTORAT

Biologie du Développement - Oncogenèse

Maryline HERBET

**APPROCHE DYNAMIQUE  
DE LA  
COOPÉRATION D'ALTÉRATIONS GÉNÉTIQUES  
DANS LA  
TUMORIGENÈSE CORTICOSURRÉNALIENNE**

Thèse dirigée par : Dr. Michaël THOMAS

Présentée et soutenue publiquement le 21 novembre 2008

Jury :

Professeur Jérôme BERTHERAT  
Docteur Antoine MARTINEZ  
Docteur Claude COCHET  
Docteur Éric BAUDIN  
Docteur Michaël THOMAS

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur



## REMERCIEMENTS

---

Mes sincères remerciements vont,

Aux membres du jury, Pr. Jérôme Bertherat, Dr. Antoine Martinez, Dr. Claude Cochet et Dr. Éric Baudin, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

À Jean-Jacques Feige, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et surtout pour sa disponibilité, notamment dans mes moments de faiblesse. Merci d'avoir été là pour me redonner confiance en moi.

À Michaël Thomas, pour m'avoir dirigée tout au long de cette thèse, pour le partage de ses connaissances, pour ses conseils et surtout pour la confiance qu'il m'a accordée. Merci aussi pour m'avoir souvent aidée dans mes manip.

À Michelle, pour m'avoir enseigné nombre de techniques à mon arrivée et pour sa gentillesse, sa bonne humeur et son soutien.

À Flavie-Flavo, pour avoir pris soin de mes souris quand je ne le pouvais pas. Merci de m'avoir apporté deux mains supplémentaires lors des moments de panique. Et puis, il y a aussi tout le reste, tellement que je ne m'en souviens plus. Alors, tout simplement, merci pour tout !!!

À Aude, pour m'avoir permis de finaliser les manip. Je sais que ce n'était pas toujours très passionnant mais sans toi, j'y serais encore !

À Delphine Q., pour le temps que tu m'as accordé pour les manip de cytométrie.

À Delphine C., pour m'avoir aidée et conseillée pour les manip de radioactivité. Et surtout, merci de m'avoir écoutée alors que tu ne me connaissais pas.

À Daniel, pour tes anticorps et pour avoir répondu avec tant de patience à toutes mes questions.

À tous les autres membres du laboratoire, pour tous leurs renseignements au quotidien.

À Alexandre, pour m'avoir rendu quelques services le weekend.



À Sev, Marie et Fophie, pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble, au labo ou en dehors. De manière plus personnelle,

Séverine alias Priscilla, merci d'avoir été là dès le début. Tu m'as permis de m'adapter rapidement au laboratoire, à ma nouvelle vie à Grenoble et d'avoir une vie sociale malgré tout ! Ces trois années resteront un excellent souvenir, entre nos soirées au Basse-Terre à la sortie du labo pour nous reconforter mutuellement, les moments de folie quand le labo était désert et les soirées à trois, toi, moi, et une bonne bouteille de vin. Et surtout merci d'avoir été là dans les moments les plus difficiles de ma vie.

Marie, merci pour ce petit grain de folie supplémentaire que tu as apporté à ce bureau. Et surtout merci pour cette incroyable gentillesse... mais comme c'est Bidart !

Fophie, merci de m'avoir si souvent accueillie chez vous (Merci Aurélien d'avoir supporté nos soirées champêtres...) et d'avoir été là pour égayer cette fin de thèse.

À Laurent, merci pour Caliméro... et plus sérieusement pour m'avoir prouvé qu'il faut savoir persévérer.

À Caro, merci pour ton écoute infaillible... et pour la personne incroyable que tu es.

À Paulette et Nat, pour leur présence à toute épreuve tout au long de ces 5 dernières années, mais aussi pour tous les souvenirs que l'on a ensemble ! Je vous adore.

À mes parents, pour m'avoir toujours soutenue et fait confiance au cours de ce long chemin de 11 ans. Vous avez toujours été présents, pour quoi que ce soit et sans vous, je n'aurais jamais pu en arriver là. Vous savoir à mes côtés m'a souvent permis de m'accrocher, vous avez tellement fait pour moi que je ne pouvais vous décevoir. J'espère que ça en aura valu la peine et qu'un jour, je pourrai vous rendre, au moins en partie tellement c'était énorme, ce que vous m'avez apporté. C'est difficile pour moi de l'exprimer de vive voix, alors j'en profite ici pour vous dire combien je vous aime.

À Guillaume, merci de m'avoir supportée, dans les deux sens du terme, pendant cette rédaction. Tu ne peux pas t'imaginer à quel point ton soutien m'a été précieux.

# ABRÉVIATIONS

AA	Acide Aminé
AC	Adénylyl Cyclase
ACS	Adénome Corticosurrénalien
ACTH	Adrenocorticotropic Hormone
AIMAH	ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
BAC	Bovine Adrenocortical Cell
$\beta$ -TrCP	$\beta$ Transducin repeat Containing Protein
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrome
CCS	Carcinome Corticosurrénalien
Cdk	Cyclin dependant kinase
CGH	Comparative Genomic Hybridisation
CK1	Casein Kinase 1
CNC	Complexe de Carney
CRE	cAMP Responsive Element
CREB	CRE-Binding protein
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
CTCF	CCCTC binding Factor
DHEA	Déhydroépiandrostérone
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	EGF Receptor
ERK	Extra-cellular signal-Regulated Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF-R	FGF Receptor
GAP	GTPase Activating Protein
GATA	GATA binding protein
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine nucleotide-Exchange Factor
GNAS	Guanine Nucleotide-binding protein, Alpha-Stimulating
GSK	Glycogen Synthase Kinase
GTP	Guanosine Triphosphate
GTPase	Enzyme de transfert de la liaison riche du GTP
HCD	Highly Conserved Domain
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
H-Ras	Harvey-Ras
hTERT	Sous-unité catalytique de la télomérase humaine
IC	Imprinting Center
IGF	Insulin-like Growth Factor (IGF-1 ou IGF-2)
IGFBP	IGF-Binding Protein
IGF-R	IGF Receptor
IHC	Immunohistochimie
KCNQ1	Potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 1
KCNQ1OT1	KCNQ1 Overlapping Transcript 1; lit 1
kDA	kilo Dalton

K-Ras	Kirsten-Ras
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LFS	Li-Fraumeni Syndrome
LH	Luteinizing Hormone
LHR	LH Receptor
LOH	Loss Of Heterozygosity
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAS	McCune-Albright Syndrome
MC2R	Melanocortin type 2 Receptor (Récepteur de l'ACTH)
MDM2	Mouse Double Minute 2
MEK	MAPK-ERK Kinase
NEM1	Néoplasie Endocrine Multiple type 1
N-Ras	Neuroblastoma-Ras
P	Surexpression de p53 <sup>DD</sup> seul
PDK-1	3-Phosphoinositide-Dependant protein Kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PPNAD	Primary Pigmented Nodular Adrenal Disease
PR	Surexpression simultanée de p53 <sup>DD</sup> et Ras <sup>G12V</sup>
P+R	Surexpression de p53 <sup>DD</sup> puis Ras <sup>G12V</sup>
PRKAR1A	Protein Kinase cAMP-dependant Regulatory type I alpha
R	Surexpression de Ras <sup>G12V</sup> seul
R+P	Surexpression de Ras <sup>G12V</sup> puis p53 <sup>DD</sup>
Rac-GEF	Rac-Guanine Exchange Factor
Rb	Retinoblastoma
RP-L27	Ribosomal Protein-L27
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
Scid	Severe combined immuno-deficiency
SF-1	Steroidogenic Factor 1
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory
SV40	Simian Virus 40
SV40-T	Antigène grand T de SV40
TGF	Transforming Growth Factor
TIAM-1	Tumor Invasion And Metastasis Inducing Protein 1
TP53	Tumor Protein p53
TCF	T-Cell factor
TCS	Tumeur Corticosurrénalienne
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family member

# INDEX DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Localisation des glandes surrénales par rapport aux reins.	21
<b>Figure 2</b> : A) Coupe transversale d'une glande surrénale indiquant le cortex et la médulla ; B) Microphotographie des subdivisions de la glande surrénale chez les mammifères (x 45).	23
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.	24
<b>Figure 4</b> : Action de l'ACTH sur la cellule corticosurrénalienne.	25
<b>Figure 5</b> : Biosynthèse des hormones stéroïdiennes dans le cortex surrénal.	28
<b>Figure 6</b> : Mécanismes de l'initiation tumorale, conduisant à la production de cellules initiées <sup>1</sup> .	31
<b>Figure 7</b> : Principales étapes de l'évolution d'une cellule normale vers une cellule cancéreuse.	33
<b>Figure 8</b> : Séquence type des modifications impliquées dans la tumorigenèse colorectale.	34
<b>Figure 9</b> : Les quatre isoformes de Ras divergent par leurs extrémités C-Terminales (Shields <i>et al.</i> , 2000).	36
<b>Figure 10</b> : Signalisation en amont de Ras. D'après Schubbert <i>et al.</i> , 2007.	36
<b>Figure 11</b> : Voies de signalisation en aval de Ras. D'après Schubbert <i>et al.</i> , 2007.	37
<b>Figure 12</b> : Représentation des quatre cascades de MAPK.	38
<b>Figure 13</b> : Implication de Ras dans la progression du cycle cellulaire.	39
<b>Figure 14</b> : Voies de signalisation induites par l'activation de l'effecteur PI3K de Ras-GTP. D'après Hennessy <i>et al.</i> , 2005 ; Shields <i>et al.</i> , 2000.	40
<b>Figure 15</b> : Schématisation d'une boucle autocrine importante pour la transformation induite par Ras. D'après Roberts and Der, 2007.	44
<b>Figure 16</b> : Représentation schématique de la protéine p53, avec ses cinq domaines fonctionnels. D'après "The p53 Web Site" <sup>6</sup> .	46
<b>Figure 17</b> : Régulation de la fonction suppressive de tumeurs de p53 (Bullock and Fersht, 2001).	47
<b>Figure 18</b> : Modifications post-traductionnelles de la région N-Terminale de p53.	48
<b>Figure 19</b> : Action de p53 sur le cycle cellulaire.	49
<b>Figure 20</b> : p53 limite l'angiogenèse en contrôlant l'activité de HIF-1 $\alpha$ . D'après Teodoro <i>et al.</i> , 2007.	51
<b>Figure 21</b> : Répartition des mutations au sein du gène <i>TP53</i> (Bullock and Fersht, 2001).	53
<b>Figure 22</b> : Organisation de la région chromosomique 11p15 chez l'homme.	55
<b>Figure 23</b> : Modèle de régulation de l'empreinte du locus <i>IGF2/H19</i> . D'après Chao and D'Amore, 2008.	56
<b>Figure 24</b> : A) Expression normale du locus 11p15 ; B) Modifications de l'expression dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann. D'après Chao and D'Amore, 2008.	57
<b>Figure 25</b> : Représentation schématique de l'isodisomie paternelle du locus 11p15. D'après Libé and Bertherat, 2005	58
<b>Figure 26</b> : Représentation de l'implication de $\beta$ -caténine dans les jonctions adhérentes via son interaction avec E-cadhérine et $\alpha$ -caténine (Kobiela and Fuchs, 2004).	59
<b>Figure 27</b> : Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Moon <i>et al.</i> , 2004).	60
<b>Figure 28</b> : Structure schématique de la protéine $\beta$ -caténine <sup>10</sup> .	61
<b>Figure 29</b> : Exemples macro- et microscopiques de lésions tumorales typiques du cortex surrénal.	65
<b>Figure 30</b> : Fréquence de la LOH du locus 17p13 (17p13 LOH), de l'isodisomie paternelle du locus 11p15 (11p15 UDP) et de la surexpression de <i>IGF2</i> , en fonction du score de Weiss (Libé <i>et al.</i> , 2007a).	75
<b>Figure 31</b> : Transplantation de cellules corticosurrénaliennes sous la capsule rénale de souris immunodéficientes surrénalectomisées et formation d'un néo-organe fonctionnel.	98

<b>Figure 32</b> : Représentation schématique de la production de BAC génétiquement modifiées.	109
<b>Figure 33</b> : Représentation schématique de l'approche moléculaire utilisée pour construire le vecteur rétroviral pLPCX- $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> .	110
<b>Figure 34</b> : Représentation schématique de l'approche moléculaire utilisée pour construire le vecteur rétroviral pLNCX2-Ras <sup>G12V</sup> .	111
<b>Figure 35</b> : Vérification par RT-PCR de la surexpression de IGF-2 et Ras <sup>G12V</sup> dans des BAC transduites avec IGF-2, Ras <sup>G12V</sup> ou IGF-2 et Ras <sup>G12V</sup> .	162
<b>Figure 36</b> : Coloration Hématoxyline & Éosine de tumeurs murines, 35 jours après la transplantation de BAC IGF-2.	163
<b>Figure 37</b> : Tumeur murine induite par la transplantation des BAC surexprimant IGF-2.	164
<b>Figure 38</b> : Coloration Hématoxyline & Éosine d'une tumeur murine formée 15 jours après la transplantation de BAC IGF-2/Ras <sup>G12V</sup> (x10).	165
<b>Figure 39</b> : Vérification par RT-PCR de la surexpression de $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> et p53 <sup>DD</sup> dans des BAC transduites avec $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> , p53 <sup>DD</sup> ou $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> et p53 <sup>DD</sup> .	167
<b>Figure 40</b> : Tumeur murine induite par la transplantation de BAC surexprimant $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> , à 21 jours post-opératoire.	168
<b>Figure 41</b> : Hyperplasie induite par la transplantation de BAC surexprimant $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> , à 10 jours post-opératoire.	169
<b>Figure 42</b> : Tumeur murine induite par la transplantation de BAC surexprimant $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> et p53 <sup>DD</sup> , à 21 jours post-opératoire.	170
<b>Figure 43</b> : Vérification par RT-PCR de l'induction de l'expression de IGF-2 dans les BAC $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> et $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> /p53 <sup>DD</sup> .	170
<b>Figure 44</b> : Schéma récapitulatif du processus multi-étapes de tumorigenèse corticosurrénalienne dans le modèle murin Ras <sup>G12V</sup> et p53 <sup>DD</sup> .	181

# INDEX DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Enzymes impliquées dans la biosynthèse des stéroïdes surrénaliens.	27
<b>Tableau 2 :</b> Différences entre tumeurs bénigne et maligne.	30
<b>Tableau 3 :</b> A) Pourcentage des mutations de Ras en fonction de l'isoforme et du type cellulaire. D'après Schubbert et al., 2007 ; B) D'autres altérations peuvent conduire à une signalisation aberrante de Ras. D'après Downward, 2003.	43
<b>Tableau 4 :</b> Gènes impliqués dans l'angiogenèse et régulés positivement ou négativement par p53. D'après Teodoro <i>et al.</i> , 2007.	52
<b>Tableau 5 :</b> Fonctions des IGFBP. D'après Clemmons, 1997.	54
<b>Tableau 6 :</b> Classification des incidentalomes surrénaliens. D'après Mantero <i>et al.</i> , 2000.	63
<b>Tableau 7 :</b> Critères positifs émis par Weiss pour l'évaluation pronostique des tumeurs corticosurrénaliennes. D'après Weiss, 1984.	72
<b>Tableau 8 :</b> Altérations génétiques des tumeurs corticosurrénaliennes sporadiques. D'après Koch <i>et al.</i> , 2002.	86
<b>Tableau 9 :</b> Récapitulatif des gènes discriminant les adénomes des carcinomes. D'après de Fraipont <i>et al.</i> , 2005.	89
<b>Tableau 10 :</b> Liste des gènes discriminant les tumeurs récidivantes des tumeurs non récidivantes. D'après de Fraipont <i>et al.</i> , 2005.	90
<b>Tableau 11 :</b> Amorces utilisées pour vérifier l'expression de l'ARNm de IGF-2 et Ras <sup>G12V</sup> dans les BAC transduites avec IGF-2, Ras <sup>G12V</sup> ou IGF-2 et Ras <sup>G12V</sup> .	162
<b>Tableau 12 :</b> Amorces utilisées pour vérifier l'expression de l'ARNm de $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> et p53 <sup>DD</sup> dans les BAC transduites avec $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> , p53 <sup>DD</sup> ou $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> .	166



# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS

ABRÉVIATIONS

INDEX DES FIGURES

INDEX DES TABLEAUX

TABLE DES MATIÈRES 11

INTRODUCTION 15

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 19

1. CORTEX SURRÉNAL 21

1.1 Glandes surrénales 21

1.2 Cortex surrénal 22

1.2.1 Histologie 22

1.2.2 Contrôle physiologique du cortex 24

1.2.3 Stéroïdogénèse 26

1.2.3.1 Régulation 26

1.2.3.2 Synthèse des stéroïdes corticosurrénaliens 26

2. PROCESSUS DE TUMORIGENÈSE 29

2.1 Généralités 29

2.2 Progression tumorale multi-étapes 30

2.2.1 Initiation 31

2.2.2 Promotion 32

2.2.3 Progression 33

2.3 Quelques gènes importants dans la tumorigenèse humaine 35

2.3.1 Ras 35

2.3.1.1 Isoformes de Ras 35

2.3.1.2 Régulation de l'activation des protéines Ras 36

2.3.1.3 Voies effectrices de Ras-GTP 37

2.3.1.4 Altération des voies Ras dans les cancers humains 42

2.3.2 p53 45

2.3.2.1 Structure de la protéine p53 45

2.3.2.2 Régulation négative de l'activité de p53 46

2.3.2.3 Activation de p53 48

2.3.2.4 Actions de p53 49

2.3.2.5 Inactivation de p53 dans les cancers humains 52

2.3.3 Locus 11p15 et IGF-2 54

2.3.3.1 Système des IGF 54

2.3.3.2 Régulation de l'expression des gènes du locus 11p15 55

2.3.3.3 Importance de la région 11p15 dans diverses pathologies, dont le cancer 56

2.3.4  $\beta$ -caténine 592.3.4.1 Fonctions de  $\beta$ -caténine 592.3.4.2 Structure de la protéine  $\beta$ -caténine 612.3.4.3 Implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la tumorigenèse humaine 62



<b>3. TUMEURS CORTICOSURRÉNALIENNES</b>	<b>63</b>
3.1 Épidémiologie	63
3.2 Tumeurs corticosurrénales bénignes	64
3.2.1 Adénomes	64
3.2.2 Hyperplasie macronodulaire	64
3.2.3 Aspects anatomo-pathologiques	65
3.2.4 Syndromes héréditaires	66
3.3 Carcinome corticosurrénalien	67
3.3.1 Aspects cliniques	67
3.3.2 Aspects anatomo-pathologiques	68
3.3.3 Syndromes héréditaires	69
3.4 Circonstances de découverte des lésions tumorales corticosurrénales	70
3.5 Diagnostic et pronostic	71
<b>4. TUMORIGÈNESE CORTICOSURRÉNALIENNE</b>	<b>73</b>
4.1 Étude de la clonalité	73
4.2 Aberrations génomiques	74
4.3 Altérations génétiques des TCS sporadiques	75
4.3.1 Altérations en rapport avec les syndromes héréditaires	76
4.3.1.1 Locus 11p15	76
4.3.1.2 TP53	77
4.3.1.3 MEN1	78
4.3.1.4 Voie de signalisation AMPc	78
4.3.2 Voie de signalisation ACTH/AMPc/PKA	79
4.3.3 Gènes classiquement impliqués dans la tumorigénèse humaine	80
4.3.3.1 Ras	80
4.3.3.2 Wnt/ $\beta$ -caténine	80
4.3.3.3 Acteurs du cycle cellulaire	81
4.3.3.4 hTERT	81
4.3.4 Facteurs de croissance	82
4.3.5 Autres gènes potentiellement impliqués	83
4.4 Études de puces à ADN	87
<b>5. MODÈLES DE TUMORIGÈNESE CORTICOSURRÉNALIENNE</b>	<b>95</b>
5.1 Xénotransplantation de cellules NCI-H295R	95
5.2 LHR et facteurs GATA	96
5.2.1 Souris sauvages gonadectomisées	96
5.2.2 Souris transgéniques gonadectomisées	96
5.2.3 Pertinence de ces modèles	97
5.3 Transplantation hétérologue de cellules : formation d'un néo-organe	98
<b>OBJECTIFS DE L'ÉTUDE</b>	<b>101</b>

<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>105</b>
1. PRÉSENTATION	107
2. SUREXPRESSION DE RAS <sup>G12V</sup> ET/OU P53 <sup>DD</sup>	113
2.1 Article soumis	113
2.2 Discussion	159
3. SUREXPRESSION DE IGF-2 ET $\beta$ -CATÉNINE <sup>S37A</sup>	161
3.1 IGF-2 et Ras <sup>G12V</sup>	161
3.2 $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> et p53 <sup>DD</sup>	165
3.3 Discussion	171
3.3.1 Surexpression de IGF-2, seul ou associé à Ras <sup>G12V</sup>	171
3.3.2 Surexpression de $\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> , seule ou associée à p53 <sup>DD</sup>	171
3.3.3 Conclusion	172
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>175</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>185</b>
<b>RÉFÉRENCES INTERNET</b>	<b>209</b>
<b>ANNEXE : INSIGHTS INTO THE ROLE OF GENETIC ALTERATIONS IN ADRENOCORTICAL TUMORIGENESIS</b>	<b>213</b>



## INTRODUCTION

---



Alors que les maladies bénignes du cortex surrénal (hyperplasies et adénomes) sont fréquentes, les carcinomes corticosurrénaux sont des cancers rares. Souvent diagnostiqués tardivement et résistants à la chimiothérapie cytotoxique, leur pronostic est sombre. Les anomalies moléculaires impliquées dans le processus tumoral ne sont pas encore clairement établies. Certes, de nombreuses études analytiques et transcriptionnelles réalisées sur des tissus sains et tumoraux ont permis d'identifier plusieurs gènes d'intérêt pouvant jouer un rôle potentiel dans la tumorigenèse corticosurrénale (*IGF-2*, *p57<sup>KIP2</sup>*, *H19*, *Ras*, *TP53*, *β-caténine*, *VEGF*), mais ces études ne représentent qu'un instantané de la tumeur et ne présagent en rien de l'évolution de la pathologie dépendante directement des altérations géniques acquises au cours des années.

Nous avons pour objectif de déterminer quels sont parmi les gènes qui ont été montrés par les études rétrospectives comme étant dérégulés, ceux qui sont à l'origine du processus tumoral ou au contraire, ceux qui varient en conséquence de la pathologie. En d'autre terme, il s'agissait de déterminer une combinaison minimale de gènes permettant de transformer des cellules normales en cellules tumorales et de tester l'hypothèse d'une progression multi-étapes au cours de laquelle une accumulation d'altérations génétiques transformerait progressivement le tissu sain en hyperplasie et/ou adénome, et finalement en carcinome.

Nous avons ainsi validé un modèle animal qui récapitule avec précision la plupart des caractéristiques du cancer corticosurrénal humain. Ce modèle nous renseigne sur les altérations génétiques minimales mais essentielles au développement tumoral et constitue, en outre, un outil inexistant à l'heure actuelle, permettant d'identifier des biomarqueurs précoces de cette transformation tumorale et de tester de nouvelles molécules thérapeutiques *in vivo*.



## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

---





# 1. CORTEX SURRÉNAL

## 1.1 Glandes surrénales

Au nombre de deux chez les mammifères, les glandes surrénales sont de petites glandes endocrines situées dans le rétropéritoine, au sein de la loge rénale : elles sont entourées par le fascia péritonéal et la capsule adipeuse du rein. Les glandes surrénales sont circonscrites par une fine capsule de 0,3 mm d'épaisseur au maximum, composée d'un tissu fibreux peu cellulaire associant fibres de collagène et fibres élastiques (Burkitt *et al.*, 1993 ; Carney, 1997). Chez un adulte normal, ces glandes ont une forme triangulaire, pèsent environ huit grammes et mesurent quatre à cinq centimètres de long, deux à quatre centimètres de large, et un centimètre d'épaisseur.

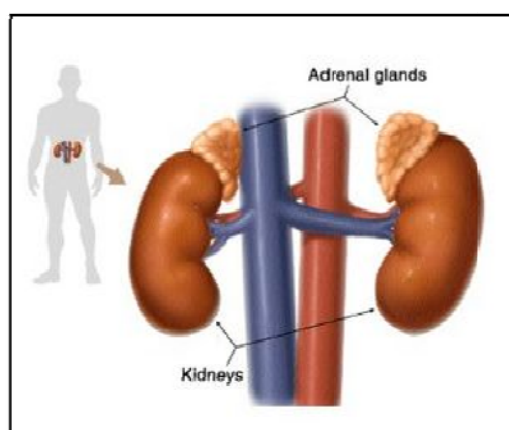


Figure 1 : Localisation des glandes surrénales par rapport aux reins.

Les surrénales sont formées de deux parties morphologiquement et fonctionnellement distinctes, et d'origine embryonnaire différente : le cortex en périphérie et la médulla au centre (Idelman and Verdeti, 2000 ; Stewart, 2003) (Figure 1). Le cortex est de consistance ferme et de coloration gris jaunâtre en raison d'une teneur élevée en lipides. Représentant près de 90% du volume de la glande, il est constitué de cellules stéroïdogènes dénommées adrénocytes, responsables de la synthèse et de la sécrétion des stéroïdes surrénaliens. La médulla, rougeâtre et de consistance molle, est constituée de cellules chromaffines qui libèrent, directement dans la circulation sanguine, de l'adrénaline, de la noradrénaline et de la dopamine. Cette zone centrale se prolonge au travers du cortex par des travées de cellules

chromaffines qui rayonnent jusqu'à la capsule surrénalienne (Idelman and Verdeti, 2000 ; Stewart, 2003).

Les surrénales sont vascularisées par plusieurs branches terminales de l'artère phrénique inférieure ; la glande gauche est parfois vascularisée par l'artère spermatique ou ovarienne gauche. Le sang circule de façon centripète, du cortex vers la médulla. Il se collecte ensuite dans la veine surrénalienne qui rejoint directement la veine cave inférieure à droite et la veine rénale à gauche. La médulla et le cortex sont innervés par des fibres du système nerveux autonome : fibres orthosympathiques issues des segments médullaires thoraciques inférieurs et lombaires supérieurs, et fibres parasympathiques issues du nerf vague. Les vaisseaux lymphatiques des surrénales se rendent aux ganglions latéro-aortiques. D'autres se rendent, à travers le diaphragme, aux ganglions prévertébraux et médiastinaux postérieurs (Rouvière, 1962).

## 1.2 Cortex surrénal

### 1.2.1 Histologie

Chez l'homme, le cortex est composé de trois zones concentriques distinctes des points de vue histologique et physiologique. De la périphérie vers le centre, il s'agit des zones glomérulée, fasciculée et réticulée (Figure 2) :

➤ **La zone glomérulée** est une fine couche située immédiatement sous la capsule surrénalienne (Burkitt *et al.*, 1993 ; Carney, 1997). Les cellules de cette zone sont disposées en petits nids ovoïdes séparés par de fins septa de tissu conjonctif renfermant les capillaires. Ces cellules sont caractérisées par un noyau rond hyperchromatique, et un cytoplasme peu abondant, riche en mitochondries et en petites vacuoles de triglycérides, substrat de la synthèse des stéroïdes.

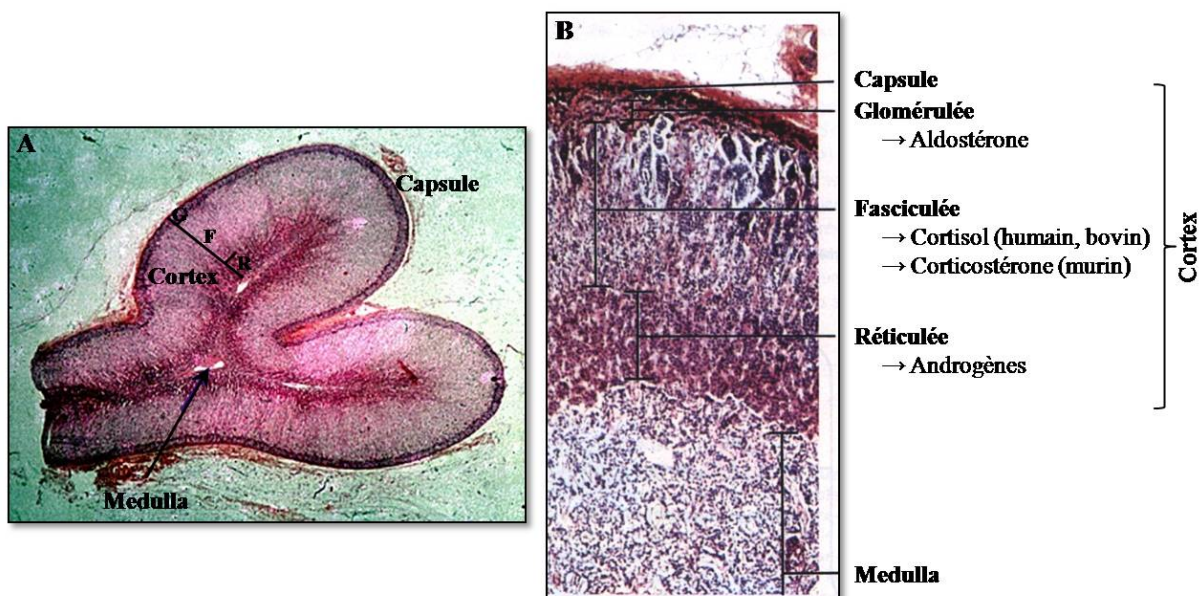
Cette zone est siège de la synthèse des hormones minéralocorticoïdes, essentiellement l'aldostérone, une hormone qui agit au niveau des reins, de la muqueuse intestinale et des glandes salivaires et sudoripares en favorisant la rétention d'eau et de sodium, et l'élimination de potassium afin de contrôler la volémie ;

➤ **La zone fasciculée**, zone intermédiaire, est la plus épaisse des trois couches, représentant plus de la moitié de l'épaisseur corticale. Les cellules forment des cordons parallèles, d'une à deux couches de cellules, perpendiculaires à la capsule. Ces cellules se caractérisent par un noyau central moins chromatique que celui des cellules de la zone glomérulée. Leur cytoplasme est abondant et riche en vacuoles lipidiques. Lors de l'inclusion en paraffine, les gouttelettes lipidiques sont dissoutes par le xylène, conférant un aspect spongieux aux cellules (spongiocytes) (Nussdorfer, 1986).

La fasciculée est le site de sécrétion des hormones glucocorticoïdes, essentiellement le cortisol chez l'humain et le bovin (Burkitt *et al.*, 1993 ; Carney, 1997). Les glucocorticoïdes agissent sur les métabolismes glucidique, protéique et lipidique, et ont un effet immunosuppresseur et anti-inflammatoire ;

➤ **La zone réticulée**, située au contact de la médulla, est la zone la plus interne du cortex surrénal. Les cellules y sont agencées en petits amas ou cordons anastomosés entourés de capillaires interdigités. Elles sont de taille intermédiaire entre les zones glomérulée et fasciculée, et ont une charge lipidique relativement faible, ce qui les a fait nommer "cellules compactes" chez l'homme (Neville and O'Hare, 1985).

Chez l'homme et les primates, la zone réticulée synthétise essentiellement des androgènes : la déhydroépiandrostérone (DHEA) et la delta-4 androstènedione (Stewart, 2003). Chez d'autres espèces, elle synthétise des glucocorticoïdes.

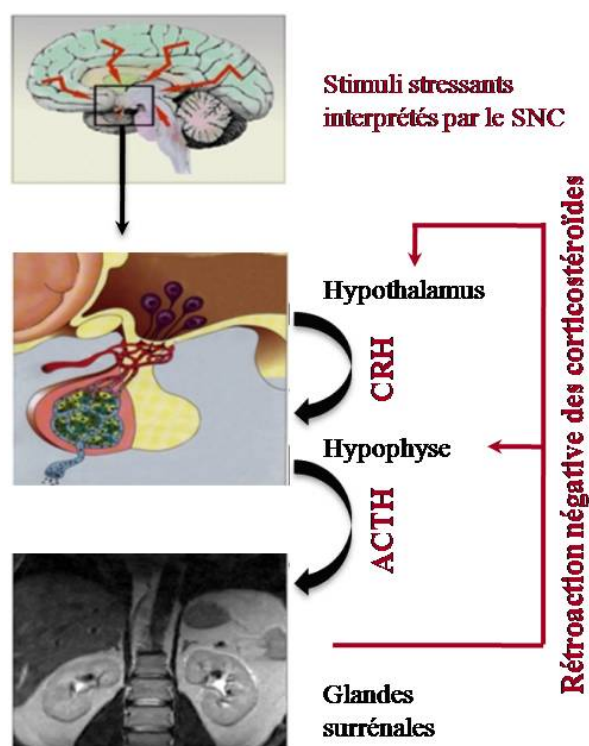


**Figure 2 :** A) Coupe transversale d'une glande surrénale indiquant le cortex et la médulla ; B) Microphotographie des subdivisions de la glande surrénale chez les mammifères (x 45).

*G* : Glomérulée ; *F* : Fasciculée ; *R* : Réticulée.

### 1.2.2 Contrôle physiologique du cortex

L'activité stéroïdogénique, la prolifération et la trophicité cellulaires du cortex surrénal sont essentiellement sous le contrôle de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). Cette hormone est sécrétée par l'antéhypophyse selon un rythme circadien parallèle à celui du cortisol. Le premier pic d'ACTH, et par conséquent de cortisol plasmatique, survient à la fin de la période de sommeil, vers 7 heures. Il est suivi d'un deuxième pic de sécrétion, moins important, vers 13 heures (Figure 3). La sécrétion d'ACTH est contrôlée par une hormone hypothalamique, la corticolibérine (CRH ; Corticotropin-Releasing Hormone), libérée par les neurones des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus. Le cortisol exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion d'ACTH et de CRH.



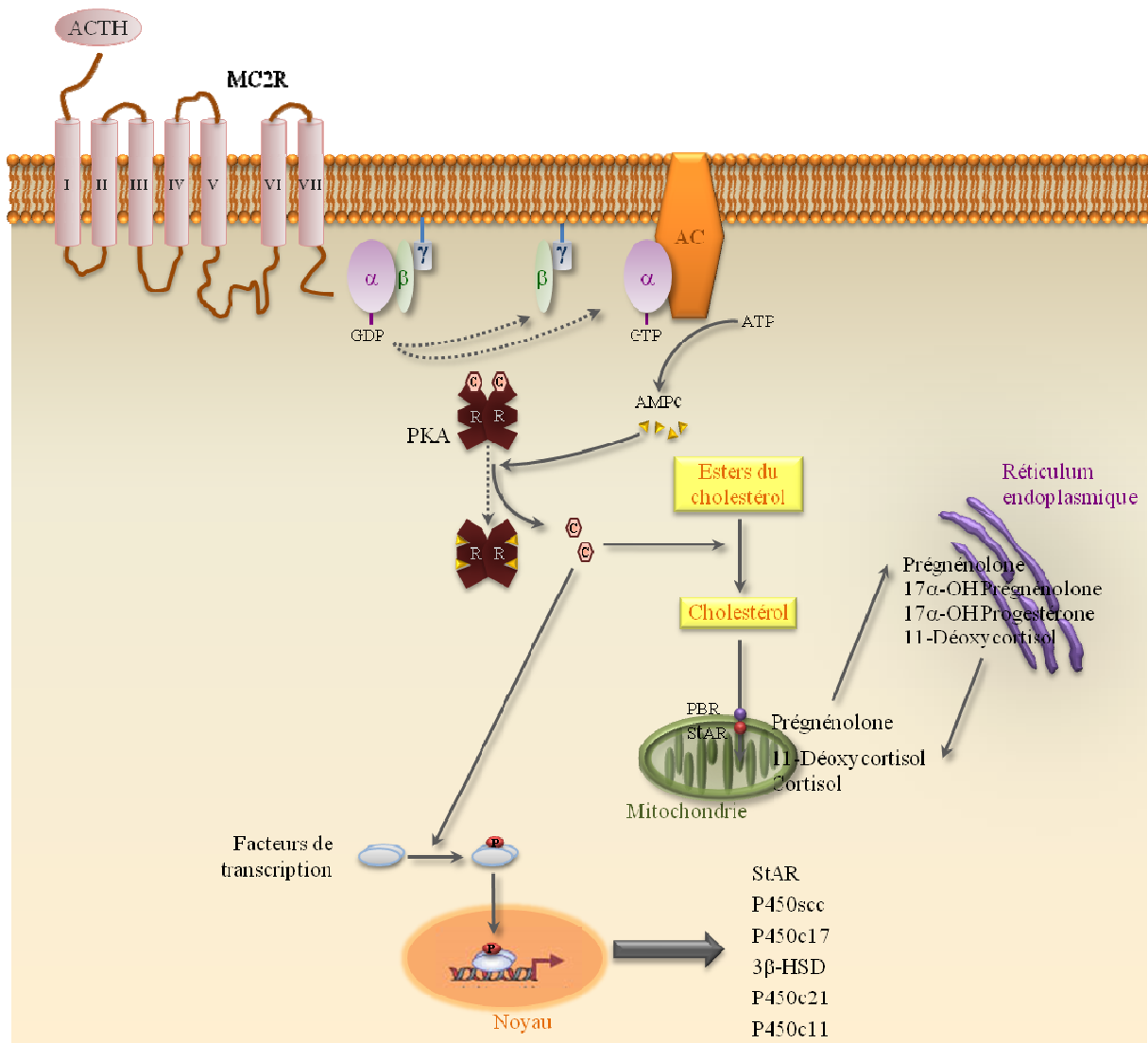
**Figure 3** : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

La CRH libérée par l'hypothalamus induit la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse. L'ACTH stimule ensuite la sécrétion de cortisol qui, en retour, exerce un rétrocontrôle négatif en inhibant la synthèse d'ACTH et de CRH.

*SNC* : Système nerveux central ; *CRH* : Corticolibérine ; *ACTH* : Hormone adrénocorticotrope.

L'action de l'ACTH sur le cortex surrénal est médiée par sa liaison à un récepteur spécifique faisant partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) : le récepteur à la mélanocortine de type 2 (MC2R) (Clark *et al.*, 2003), couplé à une protéine Gs. Lorsque MC2R est activé suite à la liaison de l'ACTH, la sous-unité

$\alpha$  de la protéine Gs se dissocie du complexe  $\beta\gamma$  et active l'enzyme adénylyl cyclase (AC). Cette enzyme catalyse la transformation d'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Lefkowitz *et al.*, 1971), second messenger à l'origine d'une large série d'événements dans la cellule corticosurrénalienne, consécutivement à l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Figure 4).



**Figure 4 :** Action de l'ACTH sur la cellule corticosurrénalienne.

Effet à court terme : activation de la stéroïdogénèse par transfert intra-mitochondrial de cholestérol. Effet à long terme : maintien de la stéroïdogénèse par phosphorylation des facteurs de transcription, synthèse d'ADN, transcription en ARNm et synthèse des enzymes stéroïdogènes.  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  : sous-unité  $\alpha$  et complexe  $\beta\gamma$  de la protéine Gs ; R : sous-unité régulatrice de la PKA ; C : sous-unité catalytique de la PKA ; CEH : Cholestérol Ester Hydrolase.

### 1.2.3 Stéroïdogénèse

#### 1.2.3.1 Régulation

Par l'intermédiaire de l'AMPc, l'ACTH exerce deux effets temporellement espacés sur la stéroïdogénèse du cortex surrénal (Kramer *et al.*, 1984). Le premier effet est à court terme (1 à 2 heures). Le signal hormonal entraîne, en quelques minutes, une stimulation de la stéroïdogénèse (DiBartolomeis and Jefcoate, 1984) via l'activation de deux voies complémentaires : i) la phosphorylation de l'enzyme cholestérol ester hydrolase (CEH) qui permet la production de cholestérol à partir des esters de cholestérol ; ii) la régulation de l'expression de la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) (Clark and Stocco, 1997) qui médie le transfert intra-mitochondrial du cholestérol (Figure 4). Le promoteur du gène de cette enzyme ne possédant pas d'éléments consensus de réponse à l'AMPc (CRE), l'induction de l'expression de *StAR* est notamment due à l'interaction de SF-1 (Steroidogenic Factor 1), facteur de transcription de la famille des récepteurs orphelins nucléaires, avec des éléments de réponse spécifiques.

A plus long terme (15 à 36 heures), la phosphorylation par la PKA de facteurs de transcription spécifiques, tels que SF-1, Sp1, CREB (cAMP Responsive Element-Binding protein) et ATF-1 (Activating Transcription Factor 1), permet l'activation de la transcription des gènes codant pour les enzymes de la stéroïdogénèse (John *et al.*, 1986) (Figure 4).

#### 1.2.3.2 Synthèse des stéroïdes corticosurrénaliens

La stéroïdogénèse fait intervenir deux catégories majeures d'enzymes : les cytochromes P450 et les déshydrogénases (Tableau 1). Les cytochromes P450 font partie de complexes enzymatiques membranaires nommés stéroïdes hydroxylases ; ils catalysent les réactions d'hydroxylation et de coupure des chaînes latérales des stéroïdes.

La synthèse des hormones stéroïdes débute par le transfert du cholestérol, du compartiment cytoplasmique à la membrane interne des mitochondries. Ce transfert est principalement médié par StAR (Jefcoate *et al.*, 1987 ; Clark and Stocco, 1997), mais également par une deuxième protéine, PBR (Peripheral-type Benzodiazepine Receptor) (Papadopoulos, 1998) (Figure 4). La première étape de la stéroïdogénèse consiste alors en la coupure, catalysée par le cytochrome P450<sub>scc</sub> (desmolase), de la chaîne latérale du cholestérol. Cette étape aboutit à la formation de prégnénolone et d'un dérivé toxique qui sera éliminé. La prégnénolone quitte

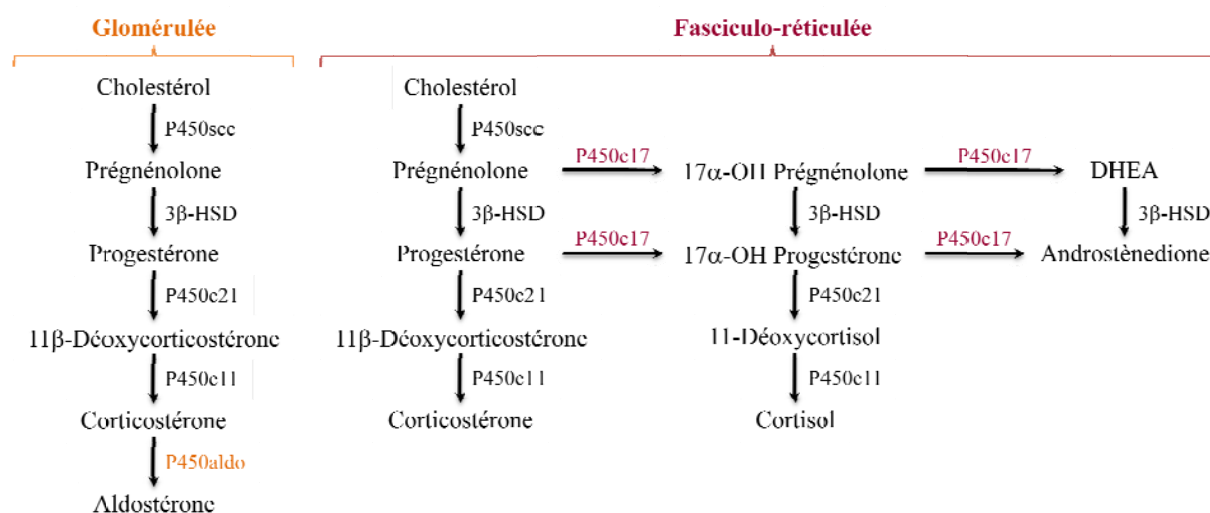
ensuite la mitochondrie pour être transférée vers la membrane du réticulum endoplasmique où elle est convertie en progestérone par l'enzyme 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -déshydrogénase type II).

TYPE	NOM	ACTIVITÉ ENZYMATIQUE	GÈNE	LOCALISATION
Cytochromes P450	P450 <sub>scc</sub>	20-22 desmolase ou scc (side chain cleavage)	<i>CYP11A1</i>	Mitochondrie
	P450 <sub>c11</sub>	11 $\beta$ -hydroxylase	<i>CYP11B1</i>	
	P450 <sub>aldo</sub>	Aldostérone synthase	<i>CYP11B2</i>	
	P450 <sub>c17</sub>	17 $\alpha$ -hydroxylase /17-20 lyase	<i>CYP17</i>	Réticulum endoplasmique
	P450 <sub>c21</sub>	21-hydroxylase	<i>CYP21A2</i>	
Déshydrogénases	3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -déshydrogénase type II	<i>HSD3B2</i>	
		17-cétostéroïde réductase	<i>HSD17B3</i>	

Tableau 1 : Enzymes impliquées dans la biosynthèse des stéroïdes surrénaliens.

Les étapes suivantes varient en fonction des zones du cortex. Dans la zone fasciculo-réticulée, le cortisol et la corticostérone sont produits grâce à l'action des enzymes P450<sub>c21</sub> (21-hydroxylase) et P450<sub>c11</sub> (11 $\beta$ -hydroxylase) (Figure 5). P450<sub>c17</sub> (17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase), également nécessaire à la synthèse de cortisol, et absente chez les espèces murines qui ne sécrètent que de la corticostérone, possède deux activités : i) l'activité 17 $\alpha$ -hydroxylase qui transforme la prégnénolone et la progestérone, et qui, en agissant seule, favorise la voie des glucocorticoïdes ; ii) l'activité 17,20 lyase qui transforme les dérivés hydroxylés de la prégnénolone et de la progestérone. Lorsque ces deux activités fonctionnent, elles favorisent la voie des androgènes surrénaliens, la DHEA et son dérivé sulfate, la DHEA-S (Figure 5). Dans la zone glomérulée, la synthèse d'aldostérone requiert les enzymes P450<sub>c21</sub> et P450<sub>aldo</sub> (aldostérone synthase). Cette dernière est exprimée uniquement dans cette zone et catalyse la transformation de corticostérone en aldostérone (Figure 5).





**Figure 5 :** Biosynthèse des hormones stéroïdiennes dans le cortex surrénal.

La 3β-déshydrogénase (3β-HSD) est très importante dans l'étape initiale de la biosynthèse des trois grandes familles de stéroïdes : les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et les androgènes. Les enzymes impliquées dans les étapes finales de la stéroïdogénèse sont P450c11 (11β-hydroxylase), P450aldo (aldostérone synthétase) et P450c17 (17α-hydroxylase/17,20-lyase). Ces deux dernières enzymes ne sont présentes, respectivement, que dans la glomérulée et la fasciculo-réticulée.

## 2. PROCESSUS DE TUMORIGENÈSE

---

### 2.1 Généralités

La prolifération cellulaire résulte d'une succession d'événements régulés par des signaux biologiques pouvant agir positivement ou négativement. Les cellules sont constamment exposées à des hormones, des facteurs de croissance ou des cytokines, ou soumises aux interactions avec des cellules voisines ou des stress chimiques, ou physiques. Plusieurs de ces signaux activent des récepteurs membranaires qui, à leur tour, activent des cascades de signalisation induisant des changements au niveau de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et le comportement cellulaire. Ces cascades de signalisation doivent être bien contrôlées afin de maintenir une homéostasie cellulaire normale. Lorsque cette homéostasie est interrompue, le comportement cellulaire peut changer et les cellules qui ont échappé aux mécanismes normaux de la division cellulaire prolifèrent de manière anormale, provoquant ainsi la formation d'une tumeur.

Une tumeur peut être bénigne ou maligne (Tableau 2). Les tumeurs bénignes sont principalement des adénomes (tumeurs d'une glande) ou des fibromes (tumeurs des tissus conjonctifs). Il s'agit de tumeurs bien limitées, qui reproduisent l'aspect du tissu d'origine. Il n'existe aucun envahissement local ni dissémination de cellules tumorales dans les autres tissus. Le cancer, ou tumeur maligne, s'oppose à la tumeur bénigne car il est mal limité, bouleverse l'aspect du tissu d'origine, l'envahit localement et envahit ensuite d'autres tissus. La classification générale des cancers repose essentiellement sur le type du tissu d'origine. Se distinguent ainsi :

- Les **carcinomes**, responsables de la majorité des cancers et qui désignent le grand groupe des tumeurs malignes des tissus épithéliaux, en opposition aux sarcomes ;
- Les **sarcomes**, tumeurs malignes qui se développent aux dépens du tissu conjonctif ou d'un tissu qui en dérive (musculaire par exemple), à cellules généralement mal différenciées ;
- Les **tumeurs du système nerveux**, dont les gliomes ;
- Les **mélanomes**, tumeurs des cellules cutanées pigmentaires ;
- Les **tumeurs des tissus embryonnaires**, et les **lymphomes** et **lymphosarcomes**.

TUMEUR BÉNIGNE	TUMEUR MALIGNE
Bien limitée	Mal limitée
Encapsulée	Non encapsulée
Semblable au tissu d'origine	+/- semblable au tissu d'origine
Pas de destruction des tissus voisins	Envahissement des tissus voisins
Cellules régulières	Cellules atypiques
Croissance lente	Croissance rapide
Pas de récurrence locale	Récurrence possible
Pas de métastases	Métastases possibles

Tableau 2 : Différences entre tumeurs bénigne et maligne.

Entre les deux états bénin et malin, il existe des lésions qui possèdent les caractéristiques de la bénignité mais qui ont un potentiel de progression vers le cancer.

## 2.2 Progression tumorale multi-étapes

La cancérogenèse est un processus complexe qui, selon des données épidémiologiques, mathématiques, cliniques, moléculaires et expérimentales, résulterait de l'acquisition d'altérations génétiques, et donc de modifications fonctionnelles, progressives et cumulatives (Nordling, 1953 ; Armitage and Doll, 1954 ; Knudson, 1971 ; Kinzler and Vogelstein, 1996).

Dans les diverses tentatives d'établir une logique pour la succession des événements qui jalonnent le chemin de la cellule normale à la cellule néoplasique, éventuellement métastatique, Hanahan et Weinberg (2000) puis Hahn et Weinberg (2002) ont proposé que les altérations des processus fonctionnels sont limitées en nombre et communes à tous les types de tumeurs malignes. Afin de mieux délimiter l'hypothèse multi-étapes des cancers, ils définissent ainsi six caractéristiques nécessaires et suffisantes à la transformation cellulaire :

- **Capacité proliférative illimitée ;**
- **Indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération cellulaire ;**
- **Insensibilité aux signaux inhibiteurs ;**
- **Abolition de l'apoptose ;**
- **Capacité de susciter l'angiogenèse ;**
- **Acquisition d'un pouvoir invasif.**

Ces propriétés seraient progressivement acquises au cours de trois étapes qui constituent le processus de tumorigenèse : l'initiation, la promotion et la progression (Hanahan and Weinberg, 2000).

### 2.2.1 Initiation

La première étape du processus de tumorigenèse est qualifiée d'initiation (Figure 6).

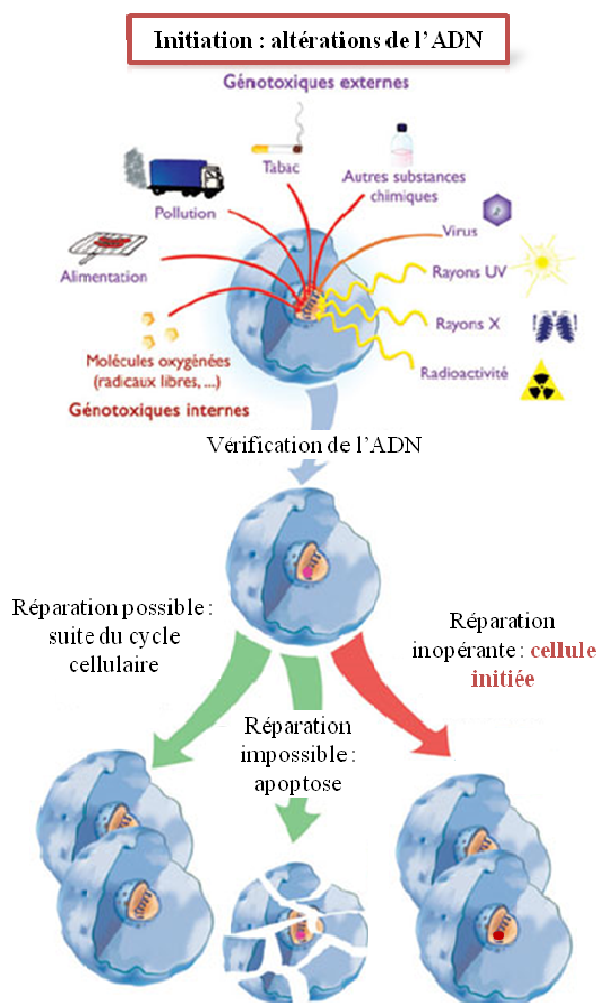


Figure 6 : Mécanismes de l'initiation tumorale, conduisant à la production de cellules initiées<sup>1</sup>.

L'initiation est la conséquence rapide de l'action d'un agent cancérigène qui altère des gènes, particulièrement ceux qui favorisent la croissance et la différenciation cellulaire (mutation du proto-oncogène *H-Ras* par exemple). Les possibilités de contrôle et de réparation à ce niveau dépendent de l'intégrité des gènes suppresseurs de tumeurs, en particulier du gène *TP53* (Tumor Protein p53). Si l'ADN n'est pas réparé, une lésion définitive est produite.

<sup>1</sup>[http://www.curie.fr/home/presse/jic\\_article.cfm/lang/\\_fr/jic\\_article/246.htm](http://www.curie.fr/home/presse/jic_article.cfm/lang/_fr/jic_article/246.htm)

Ce processus irréversible conduit à la formation de cellules dites initiées. Ces cellules ne sont cependant pas tumorales. Leur génotype est modifié, mais elles n'ont pas acquis une autonomie de croissance et sont morphologiquement non dissociables des cellules normales. Elles sont cependant définies comme immortelles, car incapables de rentrer en sénescence, processus d'arrêt irréversible de la prolifération cellulaire induit après un certain nombre de divisions (Campisi, 2001 ; Campisi *et al.*, 2001). Les cellules initiées peuvent poursuivre leurs activités normales sans jamais former de tumeurs, mais renferment en elles le potentiel d'en former.

### 2.2.2 Promotion

Suite à l'initiation, les altérations ayant modifié les gènes régulant les mécanismes de la prolifération cellulaire peuvent conduire à la prolifération clonale des cellules initiées. Les agents promoteurs favorisant cette expansion clonale sont, par exemple, des hormones, l'inflammation chronique ou des facteurs de croissance (Figure 7). A ce stade de la promotion, le processus oncogénique commence à créer des conditions favorables à l'instabilité génomique. La prolifération étant incontrôlée, les altérations génétiques s'accumulent et conduisent à la formation de cellules tumorales agressives, caractérisées par une indépendance face aux facteurs de croissance et du stroma, une absence de réponse aux signaux de différenciation, et la capacité d'induire la néo-angiogenèse.

Les agents promoteurs, seuls, ne peuvent induire le processus tumoral ; ils doivent obligatoirement agir sur les cellules initiées pour pouvoir provoquer la prolifération anormale de celles-ci. De plus, lorsque cet agent est retiré, les effets sont réversibles, au moins jusqu'à un certain stade. La suppression du promoteur ou l'utilisation de substances qui empêchent son action (substances antipromoteur) semblent donc être des voies intéressantes pour tenter de bloquer l'évolution du processus tumoral.

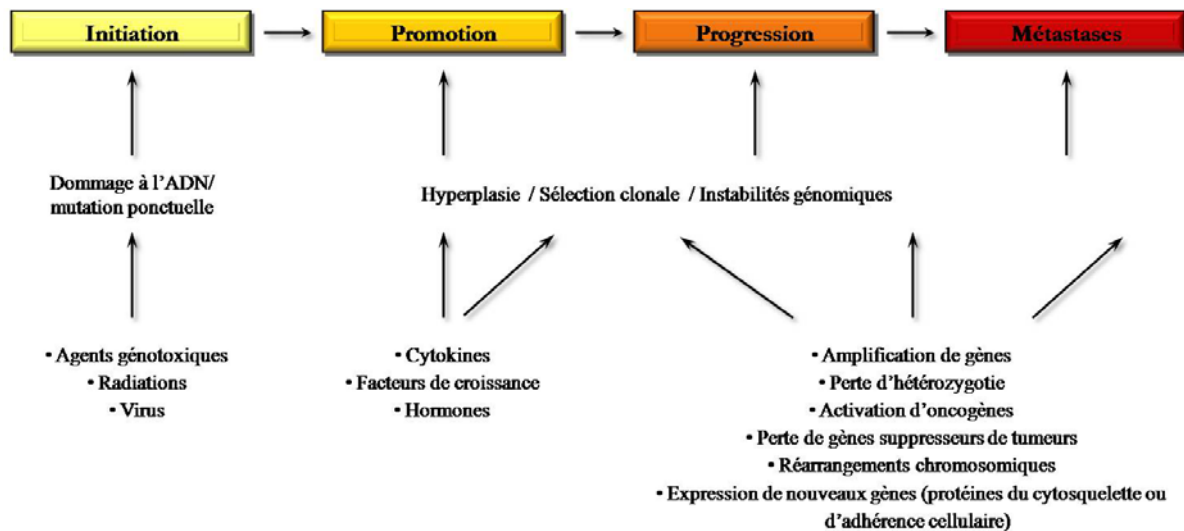


Figure 7 : Principales étapes de l'évolution d'une cellule normale vers une cellule cancéreuse.

### 2.2.3 Progression

La phase de progression ne s'applique pas à toutes les tumeurs. En effet, des cellules transformées au cours des étapes précédentes peuvent demeurer bénignes. Pour les tumeurs malignes, le caractère malin ne peut, en revanche, véritablement s'acquérir qu'au cours de cette étape (Figure 7). Se prolongeant dans le temps, la progression est caractérisée par une très forte instabilité génomique qui induit l'acquisition progressive de modifications qui confèrent aux cellules des caractéristiques de plus en plus malignes : capacités d'invasion, de dissémination métastatique ou de résistance aux antimétabolites.

Les processus d'invasion et d'acquisition d'un potentiel métastatique par les cellules cancéreuses nécessitent le passage séquentiel de nombreuses étapes. Les cellules doivent se détacher de la tumeur primitive et envahir le tissu environnant, intégrer la circulation systémique après passage à travers les vaisseaux lymphatiques ou sanguins, et envahir le site secondaire par prolifération et néo-vascularisation. Les cellules épithéliales tumorales subissent ainsi la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) caractérisée par l'acquisition d'un phénotype migratoire incluant la perte des contacts cellules/cellules et cellules/matrice extracellulaire, un remodelage du cytosquelette, et l'expression de marqueurs mésenchymateux (Thiery, 2003 ; Thiery and Sleeman, 2006).

Si nous ne pouvons aujourd'hui définir exactement quelles mutations ou pertes de gènes sont nécessaires et suffisantes à la tumorigénèse, nous savons que l'ordre d'acquisition des altérations n'est nullement aléatoire : il existe une sorte de fenêtre de permissivité, dans le temps et dans l'espace, dans laquelle une modification génétique apporterait un avantage sélectif à une cellule. Dans le cadre de la tumorigénèse colique par exemple, il est maintenant bien reconnu que les carcinomes sporadiques progressent par étapes, depuis une hyperprolifération du tissu épithélial, jusqu'à la formation d'un adénocarcinome invasif, résultat de l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques dont l'ordre est très important. La séquence des événements lors du développement du carcinome colique est, par exemple : 1) inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, 2) activation des oncogènes, 3) mutations de multiples gènes, 4) inactivation d'autres gènes suppresseurs de tumeurs et 5) accumulation d'altérations dont la nature semble plus importante que l'ordre chronologique (Cho and Vogelstein, 1992) (Figure 8).

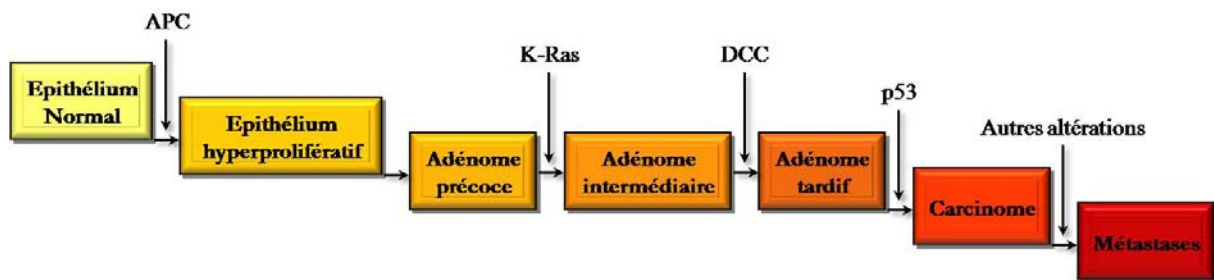


Figure 8 : Séquence type des modifications impliquées dans la tumorigénèse colorectale.

## 2.3 Quelques gènes importants dans la tumorigenèse humaine

Certaines altérations génétiques sont récurrentes dans de nombreux cancers humains. Les altérations du locus 11p15, porteur notamment du gène *IGF-2*, et les altérations des gènes *Ras*, *TP53* et  *$\beta$ -caténine*, et de leurs voies de signalisation, nous ont plus particulièrement intéressées pour cette étude.

### 2.3.1 Ras

Les protéines Ras régulent le destin cellulaire en couplant l'activation de récepteurs, notamment de récepteurs à des facteurs de croissance, à des voies de signalisation qui contrôlent la prolifération, la différenciation ou encore la survie cellulaires (Bourne *et al.*, 1990 ; Bourne *et al.*, 1991).

#### 2.3.1.1 Isoformes de Ras

Le génome humain code pour quatre isoformes protéiques de Ras : H-Ras (Harvey-Ras ; MIM 190020<sup>2</sup>), situé sur le locus 11p15.5, N-Ras (Neuroblastoma-Ras ; MIM 164790<sup>3</sup>), situé sur le locus 1p13.2, et deux formes de K-Ras (Kirsten-Ras ; MIM 190070<sup>4</sup>), K-Ras4A et K-Ras4B, produits par épissage alternatif de la région C-Terminale du gène situé en 12p12.1. Constituée de protéines de 21 kDa, appelées en conséquence p21, la famille Ras appartient à la superfamille des petites protéines G (Guanine nucleotide binding protein) qui inclue également les familles Rac, Rho, Rap et Rab (Bourne *et al.*, 1991). Ces protéines, ubiquitaires et localisées à la membrane plasmique des cellules, sont liées au GDP/GTP et possèdent une activité GTPase intrinsèque (Gibbs *et al.*, 1984) : la forme liée au GDP (Guanosine Diphosphate) est inactive, alors que celle liée au GTP (Guanosine Triphosphate) est active (Boguski and McCormick, 1993 ; Donovan *et al.*, 2002).

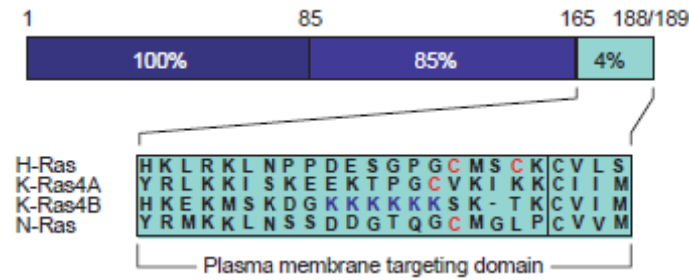
La principale différence entre les quatre protéines Ras réside dans la partie C-Terminale de leurs gènes (Figure 9). Ces régions contiennent les résidus des modifications post-transcriptionnelles qui permettent l'ancrage des protéines Ras à la membrane. Les quatre protéines Ras sont notamment farnésylées sur un motif terminal CAAX où C est une cystéine, A généralement un acide aminé aliphatique et X n'importe quel acide aminé.

<sup>2</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=190020>

<sup>3</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=164790>

<sup>4</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=190070>

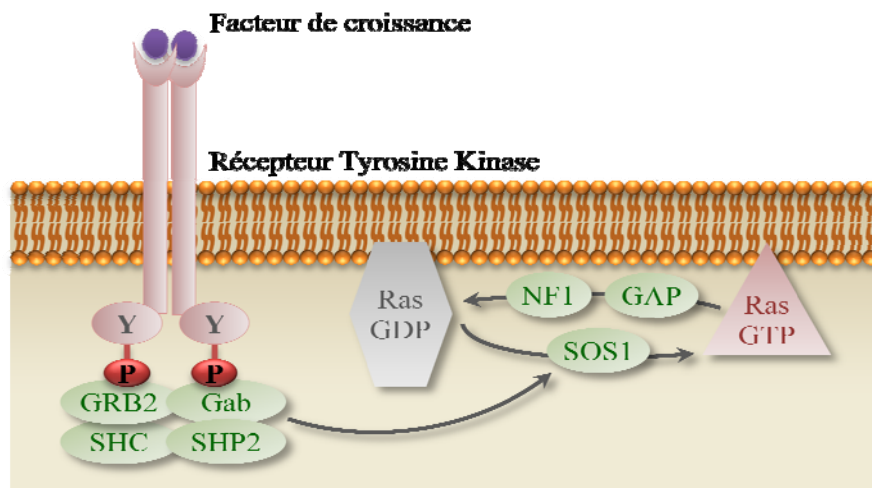




**Figure 9 :** Les quatre isoformes de Ras divergent par leurs extrémités C-Terminales. Les résidus 1 à 25 de la région N-Terminale, importants pour les interactions avec les effecteurs, sont en revanche strictement conservés (Shields *et al.*, 2000).

### 2.3.1.2 Régulation de l'activation des protéines Ras

La liaison d'un facteur de croissance à un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) résulte en la dimérisation du récepteur, son autophosphorylation et, consécutivement, en l'activation de complexes composés de protéines adaptatrices telles que SHC (SH2-containing protein), GRB2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2) et Gab (GRB2-associated binding). Ces protéines recrutent et activent des facteurs d'échange des guanines (GEF ; Guanine nucleotide-Exchange Factor), tels que des membres de la famille SOS, qui catalysent l'échange du GDP en GTP, activant ainsi Ras par modification conformationnelle (Figure 10).



**Figure 10** : Signalisation en amont de Ras. D'après Schubbert *et al.*, 2007.

Les formes actives de Ras, Ras-GTP, sont négativement régulées par les protéines GAP (GTPase Activating Protein) ou NF-1 (Neurofibromatosis type 1) qui augmentent, environ d'un facteur 100, leur activité GTPase intrinsèque (Gibbs *et al.*, 1984 ; Mitin *et al.*, 2005) (Figure 10). Dans les cellules normales, les GAP favorisent le maintien des protéines Ras sous leur forme inactive, liée au GDP.

### 2.3.1.3 Voies effectrices de Ras-GTP

Les protéines Ras-GTP régulent un réseau complexe de voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaires (Bourne *et al.*, 1990 ; Mitin *et al.*, 2005), en interagissant activement avec plus de 20 effecteurs incluant Raf, PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) et Ral-GDS (Ral-Guanine nucleotide Dissociation Stimulator) (Figure 11).

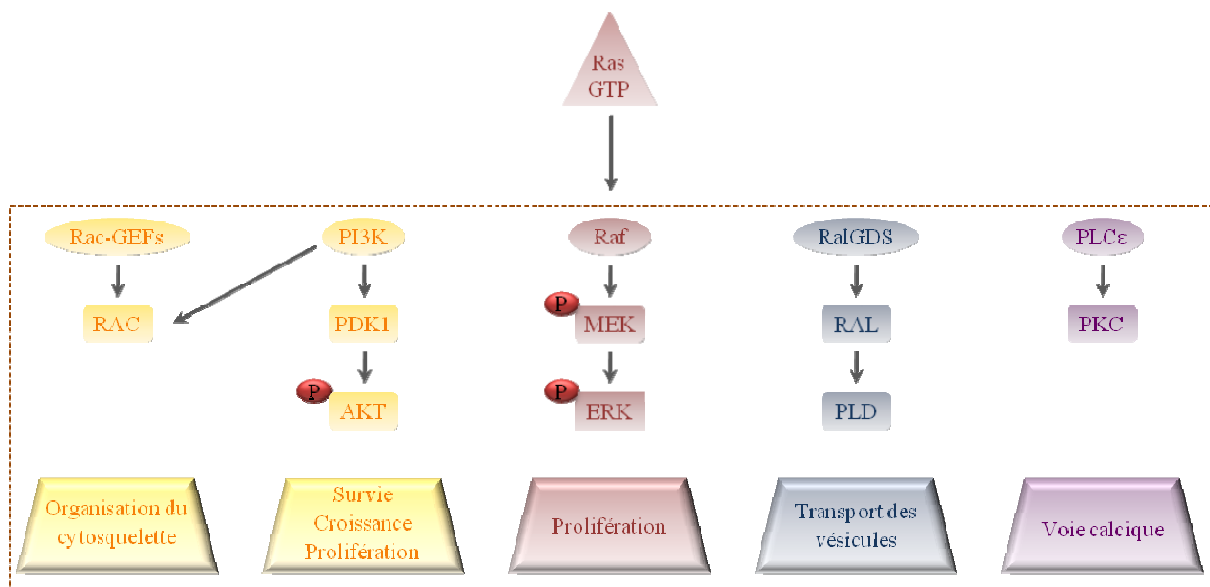


Figure 11 : Voies de signalisation en aval de Ras. D'après Schubbert *et al.*, 2007.

#### ❖ Raf

La cascade **Raf-MEK-ERK** (MEK : MAPK-ERK Kinase ; ERK : Extra-cellular signal-Regulated Kinase) est la voie effectrice de Ras la mieux caractérisée (Repasky *et al.*, 2004). Cette voie fait partie des quatre cascades de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) les plus connues dans les cellules de mammifères (Johnson and Lapadat, 2002) (Figure 12).

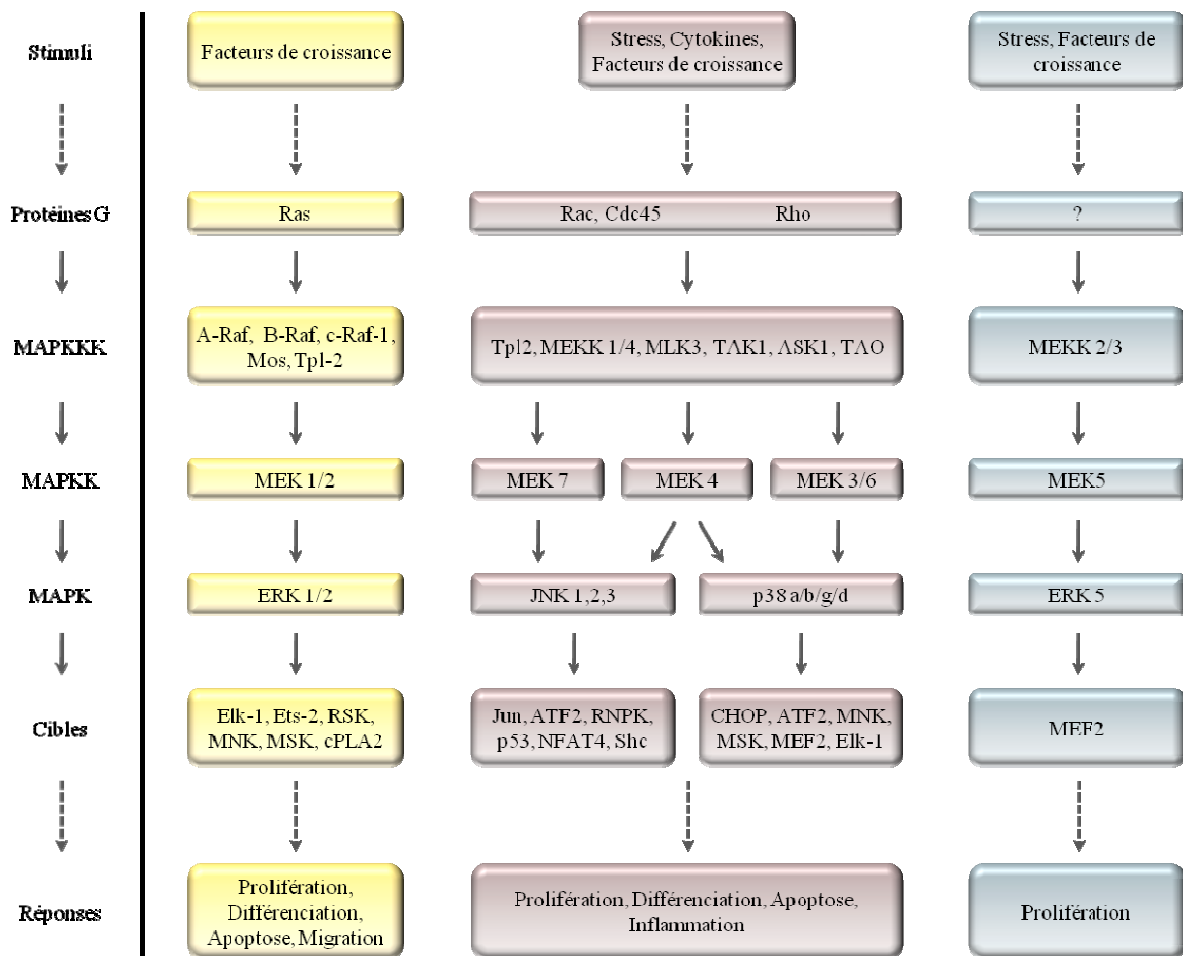


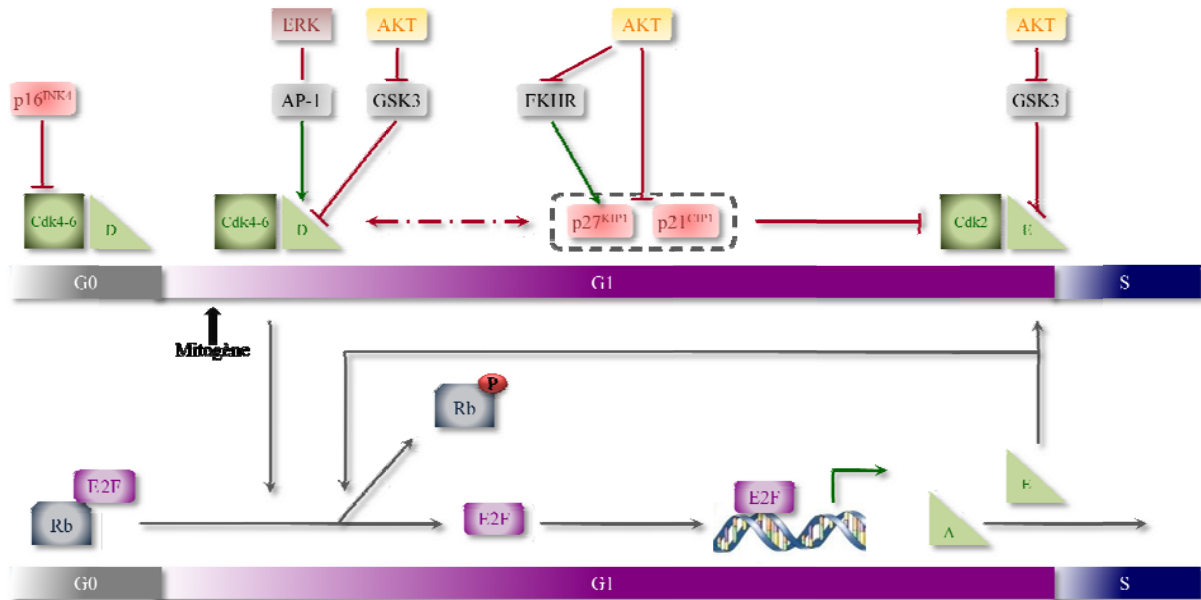
Figure 12 : Représentation des quatre cascades de MAPK.

D'après Roberts and Der, 2007 ; Dhillon *et al.*, 2007.

Ces cascades sont constituées de trois enzymes qui relaient le signal via une série de phosphorylations : les MAPK finales sont activées par des MAPKK (MAPK Kinase), elles-mêmes activées par des MAPKKK (MAPK Kinase Kinase). Les MAPKKK sont activées par des protéines de la superfamille des petites protéines G telles que Ras, en réponse à des facteurs de croissance ou des signaux de stress.

La cascade Raf-MEK-ERK (Figure 12) débute par l'activation de trois Raf sérine/thréonine kinases (A-Raf, B-Raf et c-Raf-1) qui activent la cascade des kinases MEK-ERK. Les kinases ERK phosphorylent et régulent l'activité de très nombreux substrats à la fois cytosoliques et nucléaires (Yoon and Seger, 2006). Les substrats nucléaires sont cependant les principales cibles de ERK qui, activée, est transloquée dans le noyau où elle régule l'activité de facteurs de transcription tels que Elk-1 (Zuber *et al.*, 2000 ; Schulze *et al.*, 2004). Celui-ci est un membre de la famille des protéines Ets (E26 transformation-specific sequence) qui régulent l'expression de gènes porteurs de sites SRE (Serum Responsive Element) sur leur promoteur, dont fait partie Fos (Yordy and Muijs-Helmericks, 2000). L'hétérodimère Jun-Fos constitue le facteur de transcription AP-1 (Activator Protein 1) qui stimule l'expression de gènes

contrôlant le cycle cellulaire, tels que *CCND* qui code pour la cycline D (Pruitt and Der, 2001) (Figure 13), ou des gènes codant pour des métalloprotéases matricielles (MMP) (Rutter *et al.*, 1998 ; Brauchle *et al.*, 2000), facteurs favorisant l'angiogenèse et l'invasion (Brinckerhoff *et al.*, 2000).

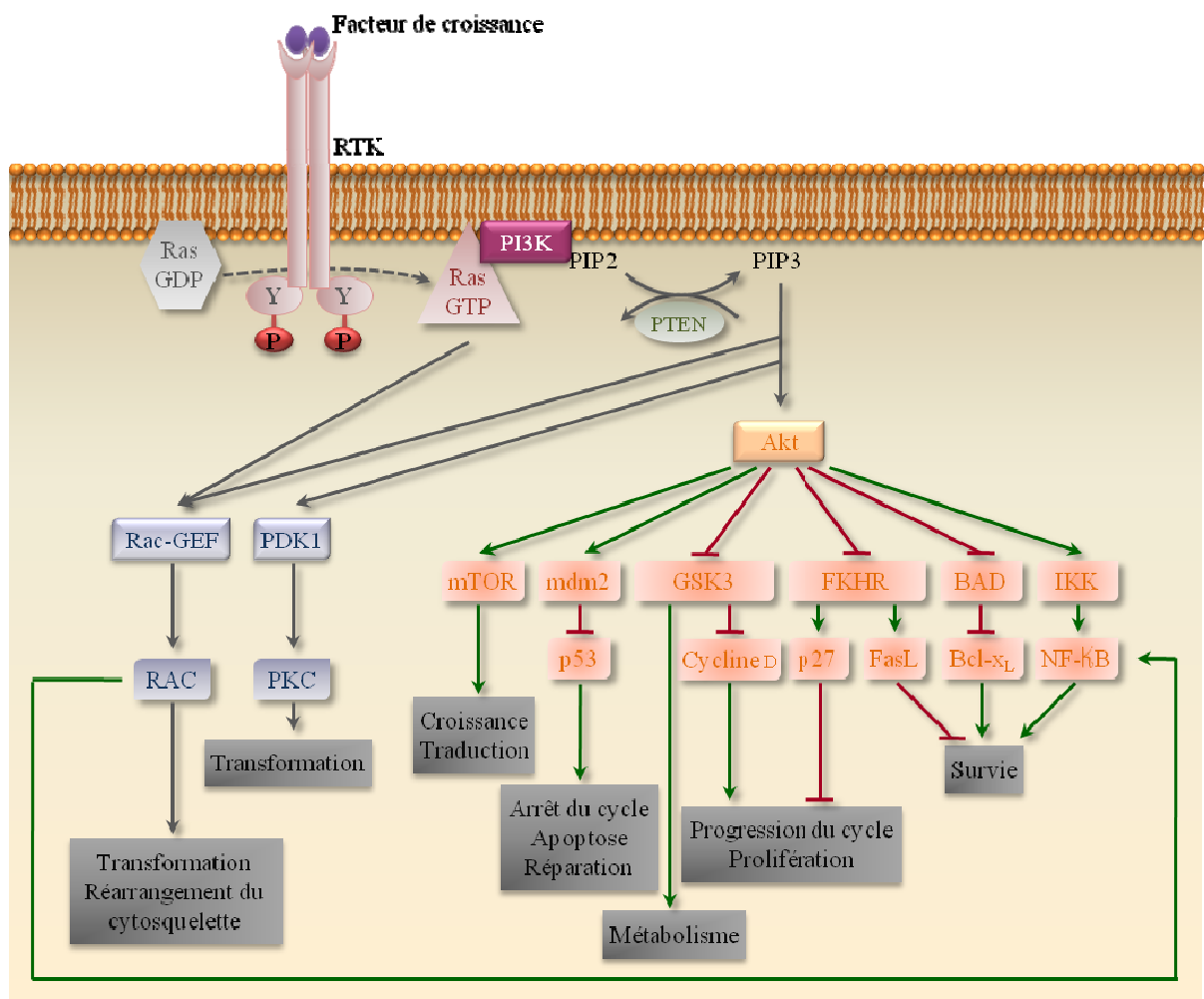


**Figure 13 :** Implication de Ras dans la progression du cycle cellulaire.

Suite à la stimulation de cellules quiescentes (en phase G0) par des facteurs mitogènes, deux pics d'activation de Ras sont observés. Le premier apparaît immédiatement après l'entrée en phase G1 et est associé à l'activation de la voie Raf/MEK/ERK. ERK induit, via le facteur de transcription AP-1, l'expression de la cycline D, ce qui, en favorisant la dissociation des complexes Rb-E2F par phosphorylation de Rb, initie la progression de la phase G1 : E2F libre induit la transcription des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, notamment les gènes codant pour les cyclines E et A. Le second pic engendre l'activation de la voie PI3K/Akt. Akt stabilise la cycline D en inhibant GSK3 par phosphorylation et favorise le maintien des complexes cycline D/Cdk4-6 en stabilisant p21<sup>CIP1</sup> et/ou p27<sup>KIP1</sup> qui agissent comme des cofacteurs positifs de ces complexes. p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>, séquestrés par les complexes cycline D/Cdk4-6, sont ensuite dégradés et ne peuvent donc plus inhiber les complexes cycline E/Cdk2. La cycline E, également stabilisée par Akt via l'inhibition de GSK3, induit une deuxième vague de phosphorylation de Rb et donc la transcription des gènes cibles de E2F, ce qui permet une accumulation de cyclines E et A, la finalisation de la phase G1, et le passage en phase S. *Rb* : Retinoblastoma ; *GSK3* : Glycogen synthase 3 ; *Cdk* : Cycline dépendant kinase ; *D* : Cycline D ; *E* : Cycline E ; *A* : Cycline A ; *p16<sup>INK4</sup>*, *p21<sup>CIP1</sup>* et *p27<sup>KIP1</sup>* : Inhibiteurs de Cdk.

## ❖ PI3K

RAS-GTP induit une autre voie de signalisation bien connue, la voie **PI3K**. La liaison de Ras-GTP à la sous-unité catalytique p110 de la PI3K (Figure 14) (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994) induit la translocation de cette enzyme à la membrane plasmique. PI3K ainsi activée phosphoryle le PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) pour générer du PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) qui active des kinases en aval telles que PDK-1 (3-Phosphoinositide-Dependant Protein Kinase 1) et Akt/PKB (Protéine Kinase B) (Bader *et al.*, 2005).



**Figure 14 :** Voies de signalisation induites par l'activation de l'effecteur PI3K de Ras-GTP.

D'après Hennessy *et al.*, 2005 ; Shields *et al.*, 2000.

L'activation de la PI3K engendre la formation de PIP3. Ce phospholipide membranaire induit l'activation des protéines kinases Akt et PDK-1, et du facteur d'échange de Rac (Rac-GEF). La voie PI3K est ainsi impliquée dans de nombreuses réponses cellulaires. Le rétrocontrôle de cette voie est assuré par le gène suppresseur de tumeurs PTEN, par déphosphorylation de PIP3 (Cully *et al.*, 2006).

En phosphorylant de nombreux substrats clés, Akt contrôle la croissance et le cycle cellulaires (Figure 13). Sa principale fonction est cependant de promouvoir la survie en bloquant diverses voies proapoptotiques : i) Akt phosphoryle et par conséquent inactive BAD (Bcl2-Antagonist of cell Death protein), protéine inhibitrice de l'activité antiapoptotique des membres de la famille Bcl (Datta *et al.*, 1997) ; ii) les facteurs de transcription de la famille Forkhead (FKHR) sont inactivés par Akt, ce qui a pour conséquence de bloquer l'expression des gènes de la famille des ligands Fas (FasL) (Tang *et al.*, 1999) ; iii) l'activation de la kinase IKK (Inducible I kappa-B Kinase) par Akt conduit à la stimulation du facteur de transcription NF-kB (Romashkova and Makarov, 1999) et donc à l'expression de gènes antiapoptotiques (Figure 14).

PIP3 active également des facteurs d'échange de Rac (Rac-GEF) (Figure 14). Les protéines Rac sont des GTPases de la famille Rho et leur activation par les Rac-GEF conduit à une réorganisation du cytosquelette via la régulation du réseau d'actine (Lambert *et al.*, 2002). Les protéines Rac peuvent également avoir un rôle antiapoptotique en activant directement le facteur de transcription NF-kB (Mayo *et al.*, 1997). Récemment, les protéines Rac-GEF et Rac ont été montrées comme étant importantes pour la transformation induite par la forme oncogénique de Ras dans certains contextes cellulaires (Malliri *et al.*, 2002).

Il est à noter que Ras-GTP peut se lier et activer directement des **Rac-GEF**, TIAM-1 (Tumor Invasion And Metastasis Inducing Protein 1) par exemple (Lambert *et al.*, 2002) (Figures 11 et 14).

#### ❖ RalGDS

Les petites GTPases Ral, qui incluent **RalGDS**, **RGL** (RalGDS-like) et **RGL-2** (Wolthuis and Bos, 1999), sont d'autres effecteurs de Ras (Figure 11). Ces facteurs d'échange activent Ral qui stimule ainsi la phospholipase D (PLD), enzyme qui régule le trafic vésiculaire (Liscovitch, 1996). Une étude récente a montré que RalGDS est nécessaire à la formation de tumeurs dans un modèle murin de carcinogenèse de la peau dépendant de Ras (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2005). L'importance de cette voie dans la tumorigenèse induite par Ras a également été montrée dans d'autres types cellulaires (Lim *et al.*, 2005).

❖ PLC $\epsilon$ 

La **phospholipase C $\epsilon$**  constitue un cinquième effecteur de Ras-GTP (Cullen, 2001) (Figure 11). Leur liaison induit une hydrolyse de PIP2 en DAG (Diacylglycérol) et inositol-1,4,5-triphosphate qui induisent le relargage de calcium et donc l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Song *et al.*, 2001).

## 2.3.1.4 Altération des voies Ras dans les cancers humains

Les trois oncogènes *Ras*, *H-Ras*, *N-Ras* et *K-Ras*, sont très couramment mutés dans les cancers humains (Shields *et al.*, 2000), dans environ 30% des cas. Le profil des mutations est à la fois spécifique du type cellulaire et de l'isoforme (Tableau 3A) ; K-Ras étant l'isoforme le plus souvent associé aux cancers humains. Dans la plupart des cas, les mutations somatiques de *Ras* touchent les codons 12, 13 et 61. Ces modifications bloquent l'activité GTPase intrinsèque et confèrent une résistance aux GAP. Ras s'accumule alors sous forme active Ras-GTP et il en résulte un excès de signaux mitotiques dû à un signal de transduction continu. Ce stress oncogénique induit une dérégulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, ce qui peut aboutir à la transformation tumorale (Burns *et al.*, 1993) et favoriser l'invasion cellulaire, et la formation de métastases, en particulier si les points de contrôle du cycle sont eux-mêmes défaillants (voie p53 inactive par exemple) (Smakman *et al.*, 2005).

A

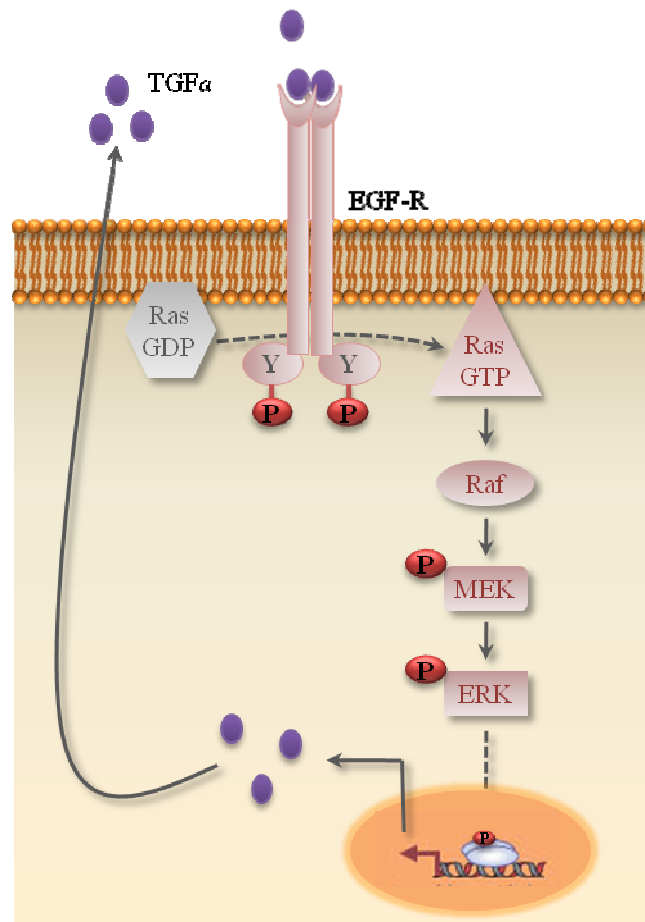
TYPE DE CANCER	<i>H-RAS</i>	<i>K-RAS</i>	<i>N-RAS</i>
Tractus biliaire	0%	33%	1%
Vessie	11%	4%	3%
Sein	0%	4%	0%
Col de l'utérus	9%	9%	1%
Côlon	0%	32%	3%
Endomètre	1%	15%	0%
Rein	0%	1%	0%
Foie	0%	8%	10%
Poumon	1%	19%	1%
Mélanome	6%	2%	18%
Leucémie myéloïde	0%	5%	14%
Ovaire	0%	17%	4%
Pancréas	0%	60%	2%
Thyroïde	5%	4%	7%

B	ALTÉRATION	CANCER	FRÉQUENCE
	B-Raf (Mutation)	Mélanome Côlon	66% 12%
	EGF-R (Surexpression)	Carcinomes*	>50%
	PTEN (Délétion)	Glioblastome Prostate Pancréas	20-30% 20% 40%
	PI3K (Amplification)	Ovaire	40%

**Tableau 3 : A)** Pourcentage des mutations de *Ras* en fonction de l'isoforme et du type cellulaire. Le pancréas, le côlon, le poumon et le tractus biliaire sont les organes les plus touchés par les mutations de *Ras* (Malumbres and Barbacid, 2003). *K-Ras* est l'isoforme le plus souvent muté. D'après Schubbert *et al.*, 2007 ; **B)** D'autres altérations peuvent conduire à une signalisation aberrante de *Ras*. \*EGF-R est surexprimé dans la plupart des carcinomes. D'après Downward, 2003.

Une signalisation aberrante de *Ras* peut être due à d'autres altérations que des mutations directes des protéines *Ras*. Une surexpression ou une mutation activatrice des RTK, dont fait partie le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor Receptor ; EGF-R) par exemple, induisent une hyperactivation de *Ras* conduisant aux mêmes effets qu'une mutation activatrice de cette protéine (Grandis and Sok, 2004 ; Lynch *et al.*, 2004) (Tableau 3B). Une cible importante de la signalisation de *Ras* dans la cascade Raf-MEK-ERK est le gène codant pour *TGF $\alpha$*  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ ), ligand de EGF-R. Une augmentation de l'expression du gène *TGF $\alpha$*  conduit à une augmentation de la sécrétion de ce facteur de croissance qui, en conséquent, hyperstimule EGF-R. Il existe donc une boucle autocrine importante pour la transformation induite par *Ras* (Roberts and Der, 2007) (Figure 15).





**Figure 15** : Schématisation d'une boucle autocrine importante pour la transformation induite par Ras lorsqu'un récepteur à activité tyrosine kinase, EGF-R par exemple, est surexprimé.

D'après Roberts and Der, 2007.

Les effecteurs de Ras ou d'autres acteurs de cette voie, tels que PTEN, peuvent également être mutés dans les cancers humains (Tableau 3B). Actuellement, la participation des effecteurs, autres que Raf et PI3K, dans la tumorigenèse induite par Ras n'est pas encore totalement bien établie. Il a cependant été montré que chez les souris déficientes en RalGDS, PLC $\epsilon$  ou TIAM-1, l'incidence de cette tumorigenèse est réduite (Malliri *et al.*, 2002 ; Bai *et al.*, 2004 ; Gonzalez-Garcia *et al.*, 2005).

### 2.3.2 p53

Surnommée “Gardien du génome” (Lane, 1992), la protéine p53 est au centre d’un réseau de voies de signalisation essentielles au contrôle du cycle cellulaire, à la réparation de l’ADN, à la différenciation, à la sénescence et à l’apoptose (Levine, 1997 ; Vogelstein *et al.*, 2000 ; Vousden and Lu, 2002).

#### 2.3.2.1 Structure de la protéine p53

Le gène *TP53* (Tumor Protein p53, MIM 191170<sup>5</sup>) est situé sur le bras court du chromosome 17, au niveau du locus 13.1 (17p13.1) (McBride *et al.*, 1986). Il code pour une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés (AA) dont le poids moléculaire de 53 kDa, chez la souris, lui a valu son nom p53. Chez l’homme, cette protéine de 55 kDa est constituée de cinq domaines fonctionnels porteurs de cinq domaines très conservés correspondant aux motifs structuraux clés de la protéine, HCD I à HCD V (Highly Conserved Domain I à V) (Soussi *et al.*, 1990) (Figure 16) :

##### **I. Région N-terminale (résidus 1 à 42)**

La région N-terminale contient le domaine de transactivation des gènes cibles (Candau *et al.*, 1997) et le site de liaison à la protéine régulatrice mdm2 (Oliner *et al.*, 1993). Cette région contient également un premier domaine très conservé, HCD I.

##### **II. Domaine de régulation riche en proline (résidus 40-92)**

Le second domaine est constitué de cinq motifs de type PXXP, où P est une proline et X n’importe quel autre acide aminé. Il comprend également un deuxième site de transactivation indépendant du premier (Candau *et al.*, 1997). Cette région, indispensable à l’induction de l’apoptose dépendante de p53 (Baptiste *et al.*, 2002), n’est toutefois pas directement nécessaire à l’action transactivatrice de p53 et participerait plutôt à la régulation de sa stabilisation (Dornan *et al.*, 2003).

##### **III. Domaine de liaison à l’ADN (résidus 101-306)**

La région centrale correspond au domaine de liaison à l’ADN (Cho *et al.*, 1994) et contient quatre des cinq domaines conservés (HCD II à V). Cette région possède également une activité 3’-5’ exonucléase impliquée dans les phénomènes de réplication et de réparation de l’ADN (Mummenbrauer *et al.*, 1996).

<sup>5</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=191170>

#### IV. Domaine d'oligomérisation (résidus 307-355)

p53 lie l'ADN sous forme de tétramères (dimères de dimères). Ce domaine d'oligomérisation consiste en un feuillet bêta suivi d'une hélice alpha nécessaire à la dimérisation de p53. Les monomères de p53 se lient entre eux par interaction de leurs régions centrales. Un signal d'export nucléaire (NES ; Nuclear Export Signal) est également présent dans ce domaine (Pavletich *et al.*, 1993).

#### V. Région C-Terminale (356-393)

La région C-Terminale contient trois signaux de localisation nucléaire (NLS ; Nuclear Localization Signal) indispensables au rôle suppresseur de tumeurs de p53 (Shaulsky *et al.*, 1990), ainsi que des sites non spécifiques de liaison à l'ADN endommagé (Jayaraman and Prives, 1995). Cette région est également impliquée dans la régulation négative de la liaison du domaine central à l'ADN (Wang and Prives, 1995). La délétion de ce domaine ou la liaison à l'anticorps pAB421 permettent une liaison constitutive de la région centrale de p53 à l'ADN (Hupp and Lane, 1994).

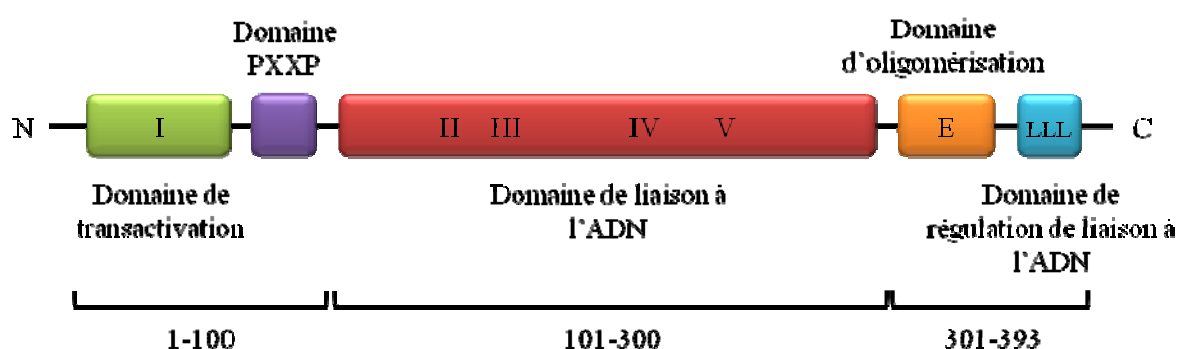


Figure 16 : Représentation schématique de la protéine p53, avec ses cinq domaines fonctionnels. D'après "The p53 Web Site"<sup>6</sup>. *E* : Nuclear Export Signal ; *L* : Nuclear Localization Signal.

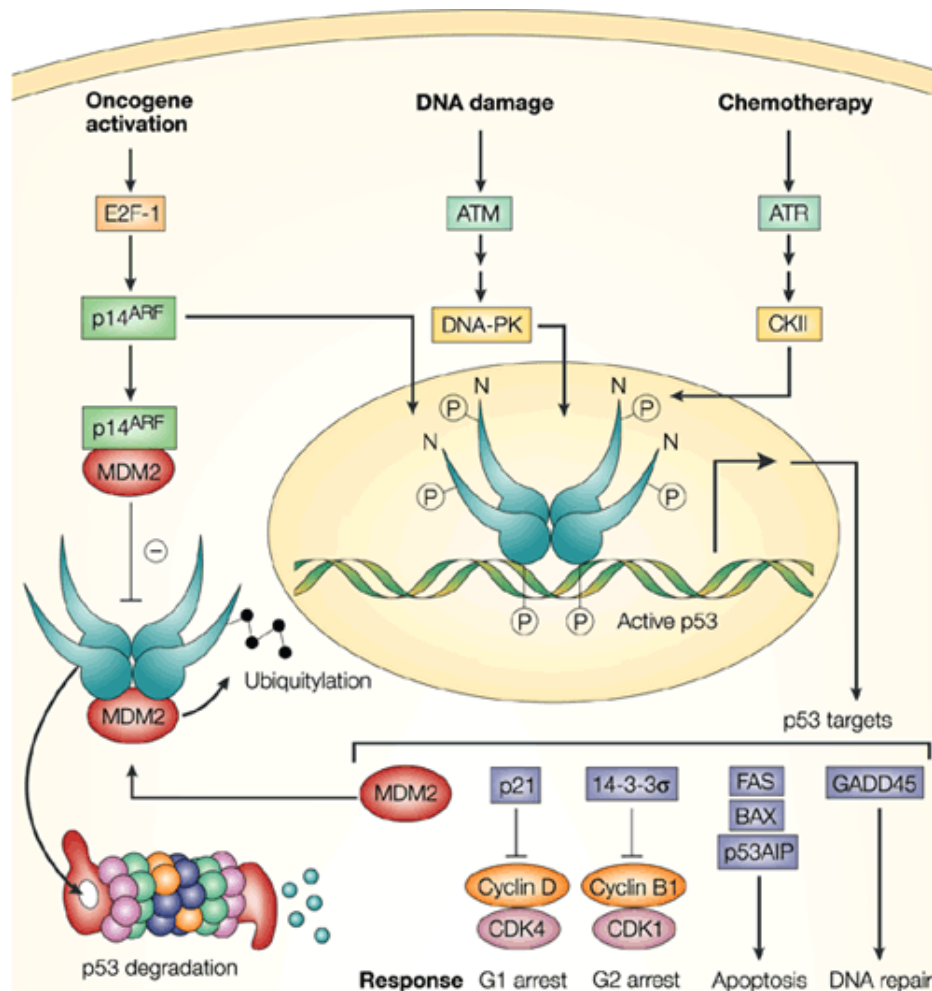
##### 2.3.2.2 Régulation négative de l'activité de p53

Bien qu'ubiquitaire, p53 est un facteur de transcription peu abondant, latent et inactif dans les cellules saines : son activité et sa stabilité sont finement régulées (Vogelstein *et al.*, 2000) par un ensemble de modulateurs qui induisent différentes modifications post-traductionnelles (Xu, 2003). Ces modulateurs incluent mdm2, COP1, pirh2 ou Jnk (Jun Kinase) (Fuchs *et al.*, 1998a ; Fuchs *et al.*, 1998b ; Mayo and Donner, 2001). mdm2 par exemple, est une ubiquitine ligase et le principal modulateur de p53. D'une part, en se fixant spécifiquement à la région N-Terminale de p53, mdm2 bloque son activité transcriptionnelle et, d'autre part, en

<sup>6</sup><http://p53.free.fr/>

ubiquitinylant la région régulatrice C-Terminale, mdm2 induit la dégradation de p53 par la voie ubiquitine-protéasome (Figure 17).

La plupart des gènes codant pour les protéines régulatrices, et c'est le cas de *mdm2*, est positivement régulée par l'activité transcriptionnelle de p53. Il existe ainsi une boucle de régulation qui favorise le maintien de la protéine p53 à un niveau faible dans les cellules normales : l'activation du gène *mdm2* par p53 conduit à une répression de l'activité de cette dernière (Figure 17).



**Figure 17** : Régulation de la fonction suppressive de tumeurs de p53.

Dans les cellules normales, la transcription de *mdm2*, dépendante de p53, promeut la dégradation de p53 par la voie ubiquitine-protéasome. En conditions de stress, lors de l'activation d'un oncogène par exemple, p14<sup>ARF</sup> est activé et séquestre mdm2. Lorsque l'ADN est altéré, ou en cas de chimiothérapie, des kinases telles que ATM et ATR sont activées. Elles phosphorylent, via DNA-PK (DNA-dépendant Protein Kinase) et CK2 (Casein Kinase 2) respectivement, la région N-Terminale de p53 afin d'empêcher la liaison de mdm2, mais également la région C-Terminale afin d'augmenter la spécificité de reconnaissance à l'ADN. Ces événements induisent la stabilisation et l'activité de p53, et, par conséquent, la transcription des gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la réparation de l'ADN, en fonction du type cellulaire et/ou du stress (Bullock and Fersht, 2001).

### 2.3.2.3 Activation de p53

L'activité de p53 est initiée en réponse à des signaux de stress qui pourraient conférer un potentiel tumoral aux cellules affectées. Ces différents stress incluent les stress génotoxiques (Kastan *et al.*, 1991), les signaux hyperprolifératifs (Lowe, 1999), l'hypoxie (Graeber *et al.*, 1994), les chocs thermiques (Graeber *et al.*, 1994) ou la culture *in vitro* (Itahana *et al.*, 2001). L'activation suit un processus en deux étapes, qui conjugue à la fois un aspect quantitatif (stabilisation et accumulation) et un aspect qualitatif (adoption d'une conformation capable d'interagir avec l'ADN). Une série de modifications post-traductionnelles coordonnées sont impliquées dans ce processus (Vogelstein *et al.*, 2000 ; Xu, 2003) (Figure 18).

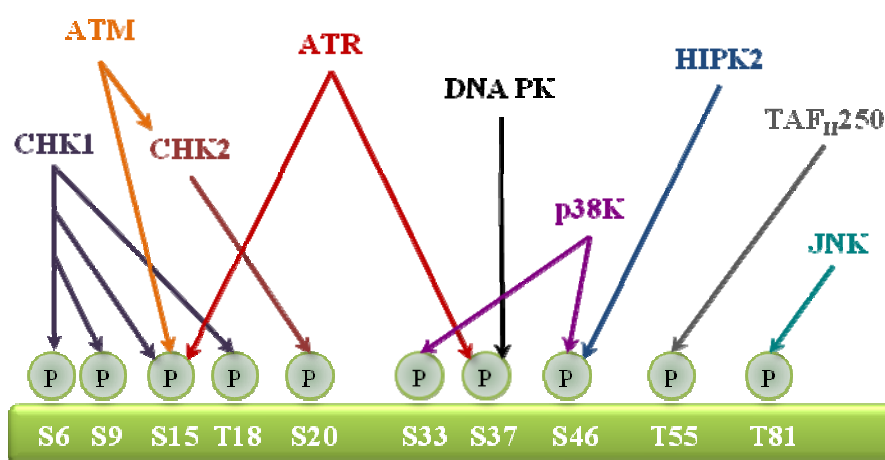
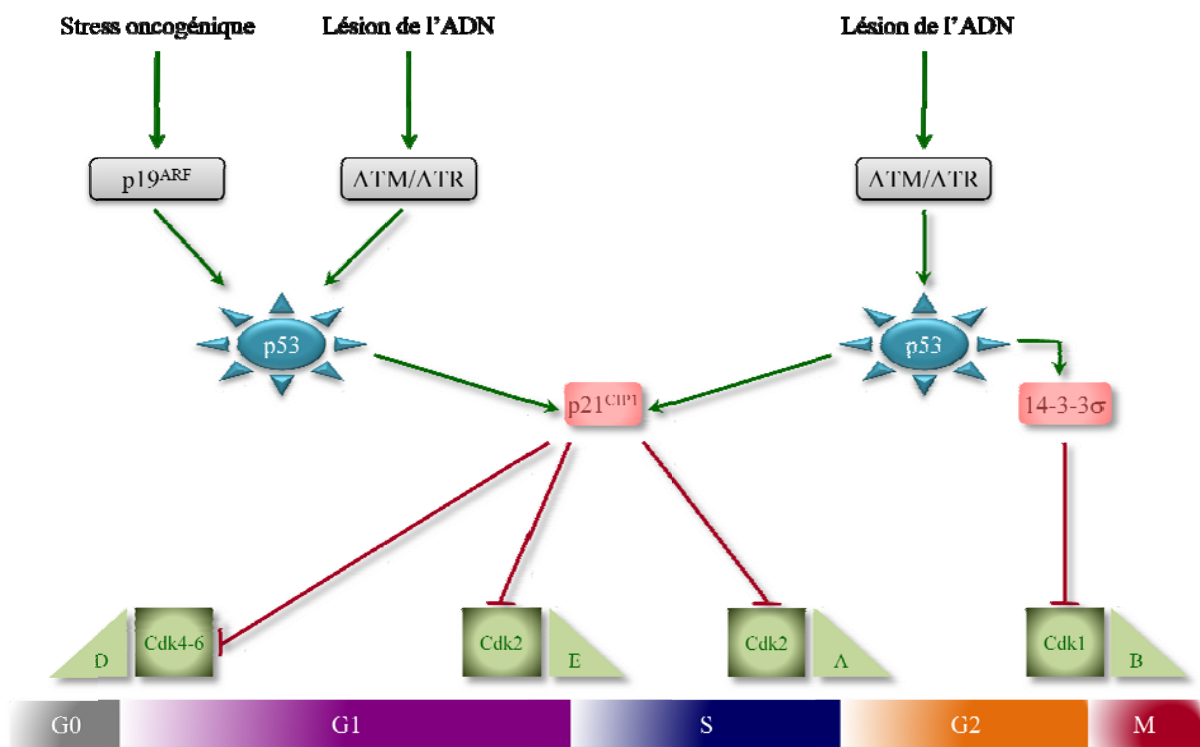


Figure 18 : Modifications post-traductionnelles de la région N-Terminale de p53.  
D'après "The p53 Web Site"<sup>6</sup>.

Dans un premier temps, de nombreuses kinases induites par les stress phosphorylent la région N-Terminale de p53, inhibant ainsi son interaction avec les régulateurs négatifs tels que mdm2 (Figure 18). Les complexes p53/mdm2 étant dissociés, p53 n'est plus dégradé par le protéasome et s'accumule rapidement dans le noyau (Figure 17). Dans un deuxième temps, une autre série de modulateurs stimulent l'activité transcriptionnelle de p53 : la région N-Terminale, libérée de son interaction avec mdm2, interagit avec ces modulateurs qui appliquent de nombreuses modifications post-traductionnelles sur le domaine d'oligomérisation et la région C-Terminale, telles que la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation ou la sumoylation.

### 2.3.2.4 Actions de p53

Les lésions de l'ADN induisent une activation de la voie p53 via l'activation des kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related). De part son activité transcriptionnelle sur le gène *CDKN1A* qui code pour p21<sup>CIP1</sup> (el-Deiry *et al.*, 1993), p53 est capable d'arrêter le cycle cellulaire en phase G1. Via son action sur 14-3-3  $\sigma$ , inhibiteur des complexes cycline B/Cdk1, p53 peut également arrêter le cycle en phase G2 (Figures 17 et 19). Ces arrêts doivent permettre la réparation de l'ADN endommagé avant le passage à la phase suivante (May and May, 1999). La cible *GADD45* (Growth Arrest and DNA Damage inducible gene) promeut ainsi la réparation (Aloni-Grinstein *et al.*, 1995 ; Guillouf *et al.*, 1995) (Figure 17). En cas d'échec, p53 favorise l'apoptose en induisant la transcription des gènes codant notamment pour Fas, Bax (Bcl2-associated X protein) et p53AIP (p53 regulated Apoptosis Inducing Protein) (Yonish-Rouach *et al.*, 1991 ; Chen *et al.*, 1996) (Figure 17).



**Figure 19 :** Action de p53 sur le cycle cellulaire.

L'activation de p53, suite à un stress oncogénique (activation de Myc ou Ras) ou à des lésions de l'ADN, induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 via l'activation de p21<sup>CIP1</sup>, ou en phase G2 via l'activation de p21<sup>CIP1</sup> ou 14-3-3 $\sigma$ . *Cdk* : Cycline dépendant kinase ; *D* : Cycline D ; *E* : Cycline E ; *A* : Cycline A ; *B* : Cycline B.

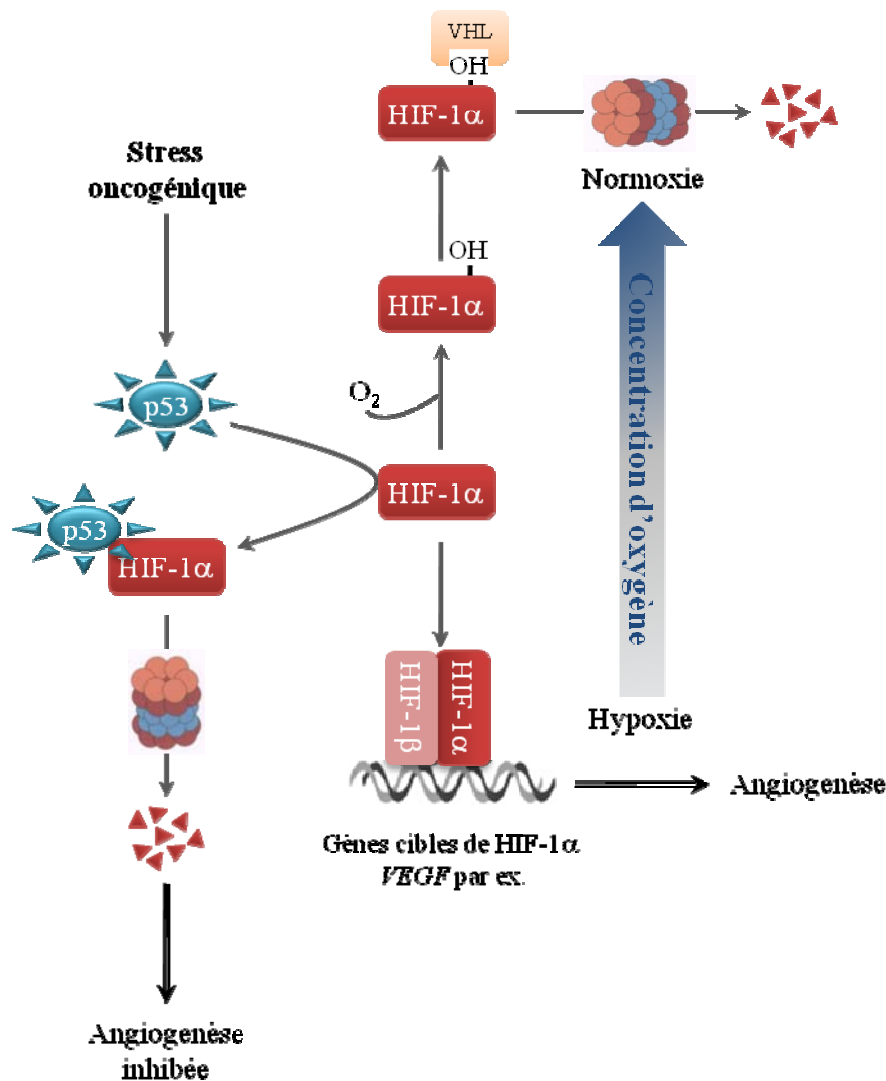
Lorsqu'un oncogène est activé (Ras ou Myc), un excès de signaux mitogènes arrivent à la cellule. Cet excès stimule l'expression de p19<sup>ARF</sup>, cible de E2F, via la dissociation des complexes inactifs Rb-E2F. p19<sup>ARF</sup>, en séquestrant mdm2, engendre l'activation de p53 (Sherr and Weber, 2000) qui stimule alors l'expression de p21<sup>CIP1</sup> (Figure 17). En inhibant les complexes cycline D/Cdk4-6 et cycline E/Cdk2, p21<sup>CIP1</sup> induit l'arrêt du cycle en phase G1. Les cellules arrêtent ainsi de proliférer et peuvent entrer en apoptose ou en sénescence (Lin *et al.*, 1998a), en fonction du type de stress oncogénique ou du type cellulaire (Figure 19). JunD régule négativement l'expression de p19<sup>ARF</sup> et protège les cellules de l'apoptose, et de la sénescence dépendante de p53 (Weitzman *et al.*, 2000). A noter que la sénescence induite par p53 est phénotypiquement identique à la sénescence répllicative induite par l'érosion des télomères.

p53 a également une influence directe sur la réparation de l'ADN : d'une part, la région C-Terminale de p53 peut se lier directement à l'ADN simple ou double brin pour permettre à l'ADN de s'associer aux différents composants de la machinerie de réparation et, d'autre part, certaines activités propres de p53, telles que le réappariement de l'ADN, le transfert de brin d'ADN ou l'activité exonucléase 3'-5', peuvent jouer un rôle dans la réparation (Liu and Kulesz-Martin, 2001).

En résumé, p53 interagit avec de nombreuses cibles moléculaires : cette protéine peut se lier spécifiquement à l'ADN par reconnaissance de séquences consensus localisées dans les régions régulatrices de gènes contrôlant le cycle cellulaire et/ou l'apoptose (Figure 17), mais elle est également capable d'interagir avec diverses protéines, dont les constituants des grosses machineries pluri-moléculaires qui contrôlent la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. p53 est donc une protéine multi-fonctionnelle, et ses effets biologiques ne peuvent être compris qu'en tenant compte du type cellulaire et de l'activation simultanée de plusieurs voies signalétiques complémentaires. A ce jour, près d'une centaine de cibles de p53, gènes ou protéines, est connue.

Outre l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation ou l'apoptose, p53 est également impliquée dans le contrôle de l'angiogenèse, selon au moins trois mécanismes qui lui permette de largement limiter le potentiel angiogène des cellules tumorales :

➤ **Interférer avec les facteurs induits par l'hypoxie** : p53 se lie directement à HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ ) et le cible pour la dégradation (Ravi *et al.*, 2000) (Figure 20) ;



**Figure 20** : p53 limite l'angiogenèse en contrôlant l'activité de HIF-1 $\alpha$ . D'après Teodoro *et al.*, 2007.  
 En conditions normoxiques, le taux de HIF-1 $\alpha$  est maintenu bas via sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. En revanche, en conditions hypoxiques, HIF-1 $\alpha$  est stabilisé et induit la transcription des gènes impliqués dans l'angiogenèse. p53, en se liant directement à HIF-1 $\alpha$ , cible cette protéine pour la dégradation, inhibant ainsi l'angiogenèse tumorale.



- **Inhiber la production de facteurs proangiogènes**, tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Pal *et al.*, 2001), ou le FGF-2 (basic Fibroblast Growth Factor) (Ueba *et al.*, 1994) (Tableau 4), selon un mécanisme transcriptionnel ;
- **Stimuler la production de facteurs antiangiogènes** (Tableau 4), toujours selon un mécanisme transcriptionnel.

GÈNES RÉPRIMÉS PAR p53	
<i>VEGF</i>	Vascular Endothelial Growth Factor
<i>FGF-2</i>	basic Fibroblast Growth Factor
<i>bFGF-BP</i>	FGF2 Binding Protein
<i>COX-2</i>	Cyclo-oxygénase-2
GÈNES INDUITS PAR p53	
<i>TSP-1</i>	Thrombospondin 1
<i>BAI-1</i>	Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1
<i>EFNA-1</i>	Ephrin-A1
<i>EPHA-2</i>	Ephrin-A1 receptor
<i>COL18A1</i>	$\alpha$ 1 collagen 18
<i>COL4A1</i>	$\alpha$ 1 collagen 4
<i>P4HA2</i>	$\alpha$ (II) 4-prolyl hydroxylase

**Tableau 4** : Gènes impliqués dans l'angiogenèse et régulés positivement ou négativement par p53.  
D'après Teodoro *et al.*, 2007.

#### 2.3.2.5 Inactivation de p53 dans les cancers humains

p53 est une protéine très souvent inactivée dans les cancers humains, principalement en raison de mutations du gène TP53. Les mutations de ce gène suppresseur de tumeurs, altérations les plus fréquentes dans les cancers humains (plus de 50% des cas) (Hollstein *et al.*, 1994), sont très diverses dans leurs natures et dans leurs positions, touchant plus de 200 codons. Environ 93% des mutations identifiées jusqu'à présent sont cependant localisées dans le domaine de liaison à l'ADN, entre les exons cinq et huit (Szymanska and Hainaut, 2003) (Figure 21). Une base de données de toutes les mutations publiées dans la littérature est maintenue au Centre International de Recherche sur le Cancer<sup>7</sup> (Olivier *et al.*, 2002).

<sup>7</sup><http://www.p53.iarc.fr/p53data-base.htm>

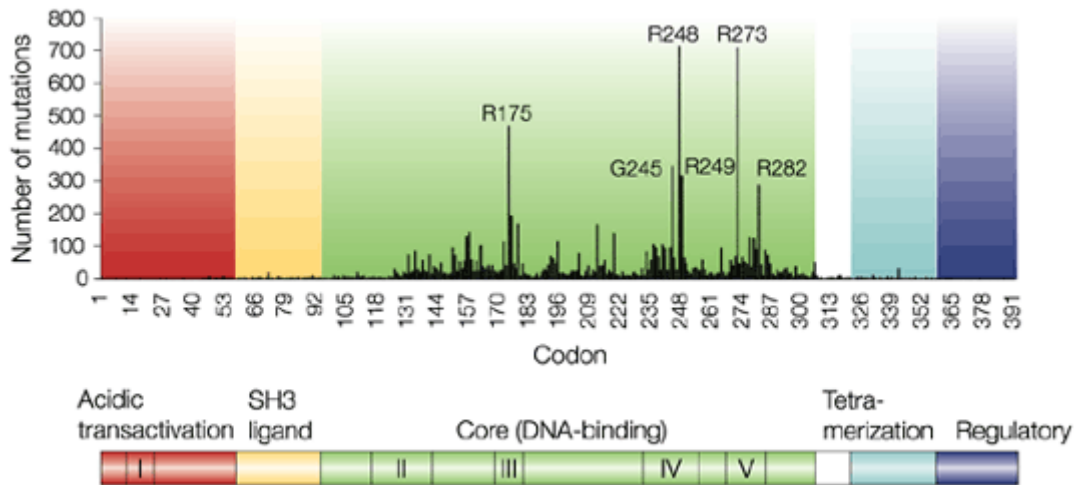


Figure 21 : Répartition des mutations au sein du gène *TP53* (Bullock and Fersht, 2001).

Si p53 est muté, l'expression de *mdm2* n'est plus régulée, ce qui résulte en une protéine p53 inhabituellement stable, qui s'accumule dans les cellules. La perte de la fonction normale de p53 entraîne une prolifération cellulaire incontrôlée, caractéristique de la progression néoplasique. Les mutations de *TP53* peuvent conduire à une perte de fonction de la protéine, mais également à un effet dominant négatif : la forme mutante serait en compétition avec la forme sauvage pour l'interaction avec les cofacteurs et les séquestrerait (Blagosklonny, 2000).

L'inactivation de p53 dans les cancers n'implique pas seulement des mutations de son gène. Elle peut également être due à diverses autres altérations telles que :

- **L'action de virus** tels que SV40 (Simian Virus 40) (Sachsenmeier and Pipas, 2001) ou HPV (Human Papillomavirus) (Thomas *et al.*, 1995), dont les protéines ciblent p53 ;
- **L'accumulation cytoplasmique de p53**, comme dans le cas du cancer du sein (Moll *et al.*, 1992) ;
- **L'accumulation de mdm2** ;
- **La mutation de PTEN** ;
- **L'activation constitutive de Akt** ;
- **La mutation de divers modulateurs en amont de p53** (ATM, p19<sup>ARF</sup>, ...).

### 2.3.3 Locus 11p15 et IGF-2

#### 2.3.3.1 Système des IGF

Le système des IGF (Insulin-like Growth Factor) est constitué de deux ligands peptidiques, IGF-1 et IGF-2, deux récepteurs, IGF1-R (IGF-1 Receptor) et IGF2-R (IGF-2 Receptor), et six protéines de liaison aux IGF, IGFBP-1 à 6 (IGF-Binding Protein 1 à 6). De par leur liaison aux IGFBP, les IGF ne circulent pas librement dans le sang. De plus, les IGFBP ont une affinité pour les IGF beaucoup plus importante que IGF1-R et leur expression est variable dans le temps, et dans l'espace. Ce sont donc d'importants modulateurs de l'action, de la disponibilité et de la distribution tissulaire des IGF (Clemmons, 1997) (Tableau 5).

La protéine IGF-2, en particulier, signale via IGF1-R (Denley *et al.*, 2005), un récepteur à activité tyrosine kinase exprimé dans presque tous les types cellulaires (Petley *et al.*, 1999). En se liant à IGF1-R, IGF-2 induit son activité tyrosine kinase, ce qui conduit à la phosphorylation de médiateurs, notamment IRS-1 (Insulin Receptor Substrate 1). Ce dernier phosphoryle les cascades Ras/Raf/MAPK et PI3K/Akt, stimulant, en fonction du type cellulaire, la différenciation, la prolifération ou les deux (Baserga *et al.*, 2003). IGF-2 se lie également à IGF2-R, récepteur pour lequel il a une très forte affinité et dont il est le principal ligand. Ce récepteur ne transduit cependant aucun signal ; il sert principalement à limiter le taux de IGF-2 en le ciblant pour la dégradation (Scott and Firth, 2004).

IGFBP-1	Stimule l'action de IGF-1 en conditions physiologiques Inhibe les activités mitogéniques de IGF-1 et IGF-2 lorsqu'il est en excès
IGFBP-2	Inhibe la synthèse d'ADN induite par les IGF Stimule les effets des IGF
IGFBP-3	Principal transporteur des IGF et modulateur de l'action endocrine des IGF Potentialise l'action des IGF Inhibe l'activité des IGF lorsqu'il est en excès
IGFBP-4	Expression tissu-spécifique Inhibe les actions des IGF Concentration sérique faible
IGFBP-5	Sa liaison à la matrice extracellulaire diminue son affinité pour les IGF : augmentation de l'activité des IGF
IGFBP-6	Se lie spécifiquement à IGF-2, avec une action généralement inhibitrice

Tableau 5 : Fonctions des IGFBP. D'après Clemmons, 1997.

### 2.3.3.2 Régulation de l'expression des gènes du locus 11p15

Le gène *IGF-2* (Insulin-like Growth Factor 2 – Somatomedin A, MIM 147470<sup>8</sup>) est localisé sur le locus 11p15 et code pour un facteur de croissance important pour le développement fœtal, et placentaire (Constancia *et al.*, 2002). Sur ce locus, sont également présents le gène *H19* qui code pour un ARN non codant dont la fonction, mal connue, est probablement de réguler l'expression de *IGF-2*, le gène *CDKN1C* ( $p57^{KIP2}$ ) qui code pour un inhibiteur de Cdk important pour la régulation du cycle cellulaire et le gène *KCNQ1* qui code pour un canal potassique voltage dépendant (potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 1) (Maher and Reik, 2000) (Figure 22).

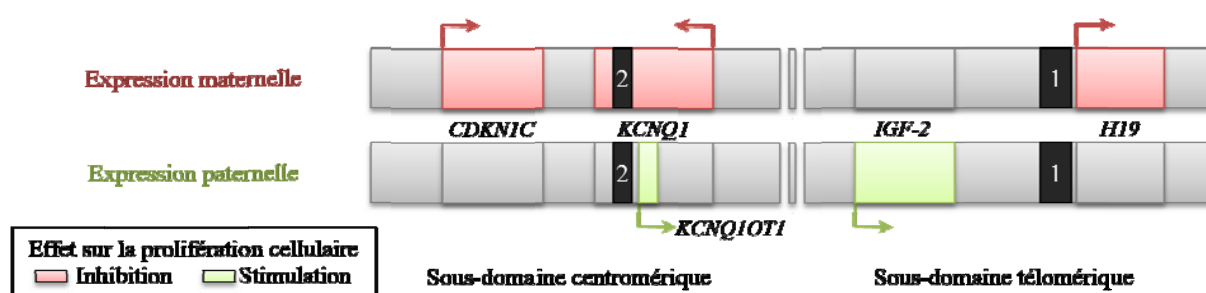


Figure 22 : Organisation de la région chromosomique 11p15 chez l'homme.

*IGF-2* est uniquement exprimé à partir de l'allèle paternel, alors que *H19*, *KCNQ1* et *CDKN1C* ( $p57^{KIP2}$ ) sont uniquement exprimés à partir de l'allèle maternel. 1 : IC1 ; 2 : IC2.

La région 11p15 est une des régions soumises à l'empreinte parentale la mieux caractérisée. Elle est organisée en deux domaines d'empreinte régulés par leur propre centre d'empreinte : imprinting center (IC) 1 pour le domaine télomérique comportant les gènes *H19* et *IGF-2* (DeChiara *et al.*, 1991 ; Hao *et al.*, 1993), et IC2 pour le domaine centromérique qui comporte, entre autres, les gènes *KCNQ1* et *CDKN1C* ( $p57^{KIP2}$ ) (Lee *et al.*, 1995 ; Matsuoka *et al.*, 1995) (Figure 22). IC1 et IC2 présentent une méthylation différentielle entre les deux allèles parentaux ; IC1 est méthylé sur l'allèle paternel, IC2 sur l'allèle maternel.

IC1 est situé en amont du promoteur de *H19*. Cette région possède des sites de liaison pour la protéine CTCF (CCCTC binding Factor), protéine qui délimite les domaines actifs et inactifs de la chromatine (Ohlsson *et al.*, 2001). Sur l'allèle paternel, la méthylation des îlots CpG de IC1 au niveau du site de reconnaissance de CTCF, empêche la liaison de cette protéine. L'enhancer agit ainsi sur le promoteur de *IGF-2* pour induire son expression (Rainier *et al.*, 1993). De plus, sur ce même allèle, la méthylation progressive de *H19* au cours du

<sup>8</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=147470>

développement induit la mise sous silence de ce gène (Figure 23). A l'inverse, sur le chromosome maternel, *H19* et IC1 ne sont pas méthylés. Par conséquent, *IGF-2*, isolé de son enhancer par CTCF fixée sur IC1 non méthylé, n'est pas transcrit, contrairement à *H19* (Figure 23). Si IC1 est délété, l'expression de *IGF-2* à partir de l'allèle maternel est réactivée (Thorvaldsen *et al.*, 2006) (Figure 23).



Figure 23 : Modèle de régulation de l'empreinte du locus *IGF2/H19*.

1. IC1. D'après Chao and D'Amore, 2008.

IC2 est localisé dans un intron du gène *KCNQ1* et contient un promoteur. Sur l'allèle paternel, où IC2 n'est pas méthylé, un ARN non codant, *KCNQ1OT1* (*KCNQ1* Overlapping Transcript 1 ; lit 1) est transcrit. Cet ARN, en partie complémentaire de *KCNQ1*, est très probablement impliqué dans la mise sous silence de tout le domaine centromérique sur le chromosome paternel, dont fait partie le gène *CDKN1C*. Sur l'allèle maternel, à l'inverse, IC2 est méthylé et l'ARN non codant n'est pas transcrit ; *CDKN1C* et *KCNQ1* sont exprimés (Zhang and Tycko, 1992 ; Hatada and Mukai, 1995).

### 2.3.3.3 Importance de la région 11p15 dans diverses pathologies, dont le cancer

Les marques épigénétiques des centres d'empreintes du locus 11p15 sont installées dans les cellules germinales et sont maintenues lors du développement, après la fécondation. Ce maintien est très important pour assurer une expression finement régulée des gènes soumis à l'empreinte, au risque de développer de nombreux désordres tels que le syndrome de Silver-Russell (SRS) ou le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS). Dans le SRS, une perte de méthylation au niveau de l'IC1 paternel est retrouvée dans un tiers des cas (Gicquel *et al.*, 2005) : l'expression de *IGF-2* est très fortement réduite, d'où le nanisme, alors que *H19* est exprimé à partir des deux allèles. A l'opposé, le BWS est caractérisé notamment par un gigantisme et résulte, dans la moitié des cas, de dérégulations épigénétiques de l'IC2

maternel. Une déméthylation à cet endroit induit l'expression bi-allélique du transcrit non codant *KCNQ1OT1* et la réduction de l'expression de *CDKN1C* (Reik *et al.*, 2000 ; Gaston *et al.*, 2001 ; Arney, 2003 ; Yang *et al.*, 2003) (Figure 24). Ce dernier étant un facteur de limitation de la croissance, il est tentant de le désigner comme responsable de ce syndrome dans cette configuration-ci. Le fait que certains cas de BWS soient dus à une mutation génétique de *CDKN1C* vient renforcer cette hypothèse (Figure 24).

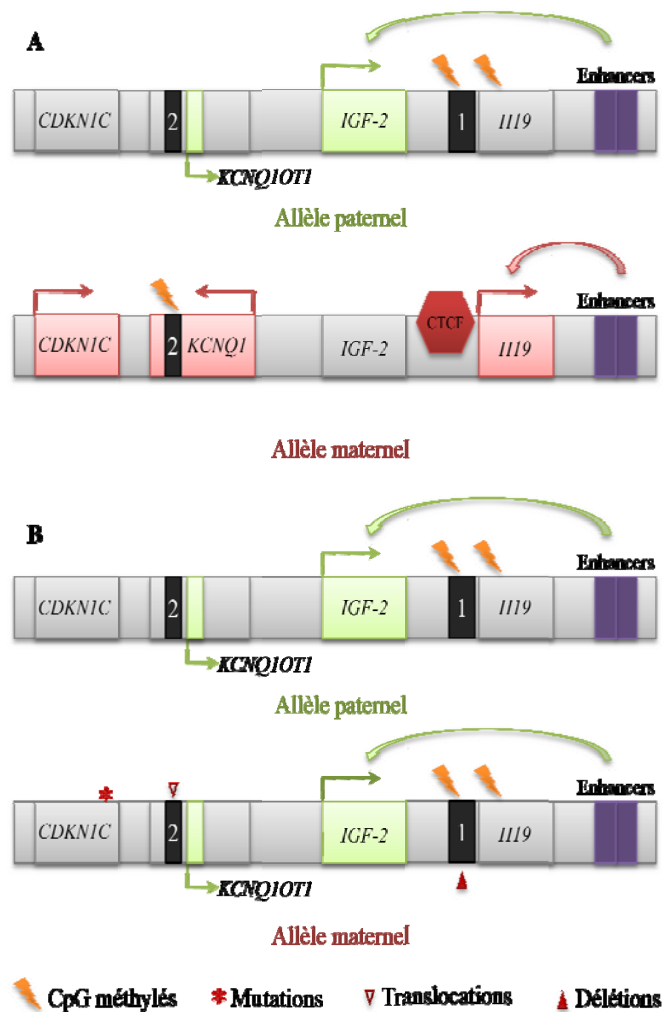


Figure 24 : A) Expression normale du locus 11p15 ; B) Modifications de l'expression dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann. 1 : IC1 ; 2 : IC2. D'après Chao and D'Amore, 2008.

Le BWS est également étroitement lié à une surexpression de *IGF-2*. A l'origine de cette anomalie, se trouve en général une isodisomie paternelle de la région 11p15 avec perte de l'allèle maternel et duplication de l'allèle paternel (modifications génétiques, 23% des cas) (Figure 25) (Reik *et al.*, 2000). Mais dans des 10% des cas, le BWS est associé à des modifications épigénétiques avec hyperméthylation isolée de l'IC1 paternel : *IGF-2* est

exprimé de façon bi-allélique, ce qui explique la surcroissance, alors que le gène *H19* est réduit au silence (Figures 24 et 25).

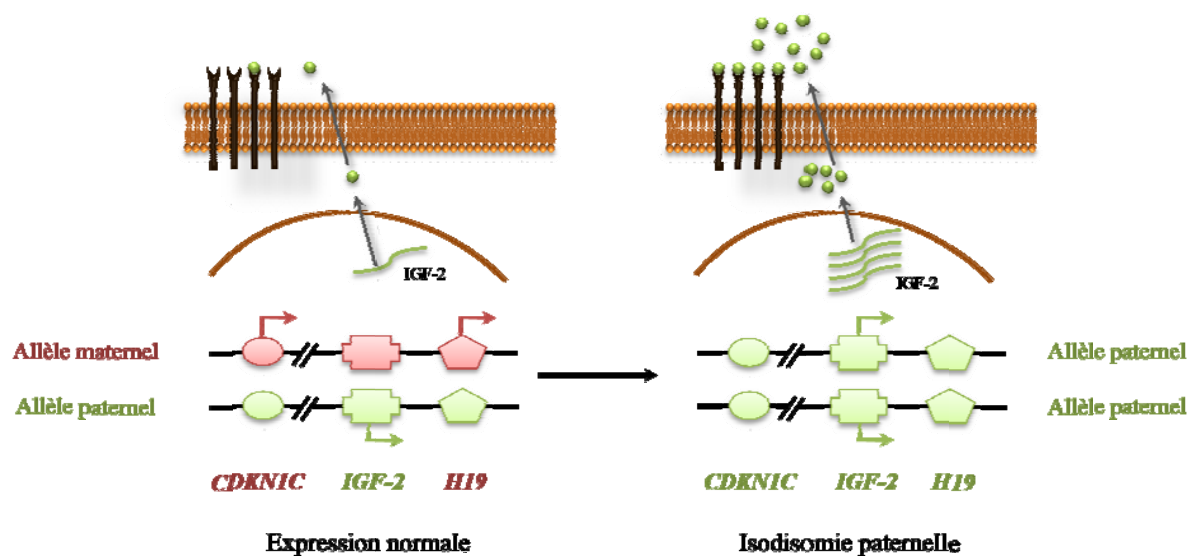


Figure 25 : Représentation schématique de l'isodisomie paternelle du locus 11p15.  
D'après Libé and Bertherat, 2005.

Outre les désordres développementaux, une surexpression de *IGF-2* est observée dans de nombreux types de cancers chez l'adulte : sein, foie, poumon, testicules (McCann *et al.*, 1996). Chez l'enfant, les tumeurs de Wilms, tumeurs pédiatriques du rein, sont dues dans plus de 50% des cas à une surexpression de *IGF-2* très souvent associée à des modifications de l'empreinte (Ravenel *et al.*, 2001).

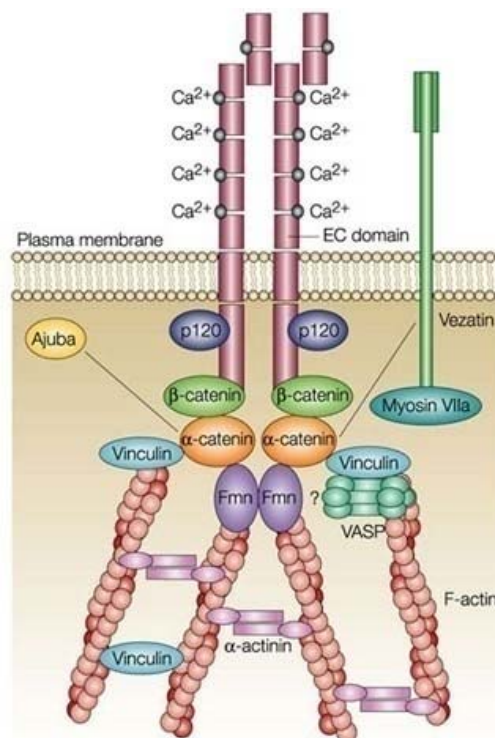
IGF-2 serait également impliqué dans l'angiogenèse en régulant positivement VEGF (Kwon *et al.*, 2004 ; Kim and Kim, 2005). Dans les cellules d'hépatocarcinomes, l'expression de VEGF, dépendante de l'hypoxie, est accrue par IGF-2 qui est lui-même induit par les molécules HIF (Kim *et al.*, 1998). D'autres études ont suggéré que IGF-2 stimulerait VEGF en partie en augmentant le taux de protéines HIF (Kwon *et al.*, 2004 ; Kim and Kim, 2005). Parce qu'une augmentation réciproque de l'expression de IGF-2 et HIF a été démontrée (Feldser *et al.*, 1999), on peut penser qu'ils agissent en synergie pour induire VEGF. Même si le mécanisme d'induction de VEGF par IGF-2 reste à être élucidé, ces données accentuent l'importance de IGF-2 dans l'oncogenèse.

## 2.3.4 $\beta$ -caténine

### 2.3.4.1 Fonctions de $\beta$ -caténine

$\beta$ -caténine est une protéine bi-fonctionnelle de part sa participation aux jonctions adhérentes (Kemler, 1993 ; Lilien and Balsamo, 2005) et à la voie de signalisation Wnt (Wingless-type MMTV integration site family member) (Giles *et al.*, 2003 ; Bienz, 2005) qui joue un rôle essentiel au cours de l'embryogenèse précoce et dans le contrôle de la prolifération des cellules souches des tissus adultes (Reya and Clevers, 2005 ; Willert and Jones, 2006). De par ces deux implications, il existe donc deux pools de  $\beta$ -caténine dans les cellules, l'un membranaire et l'autre cytoplasmique.

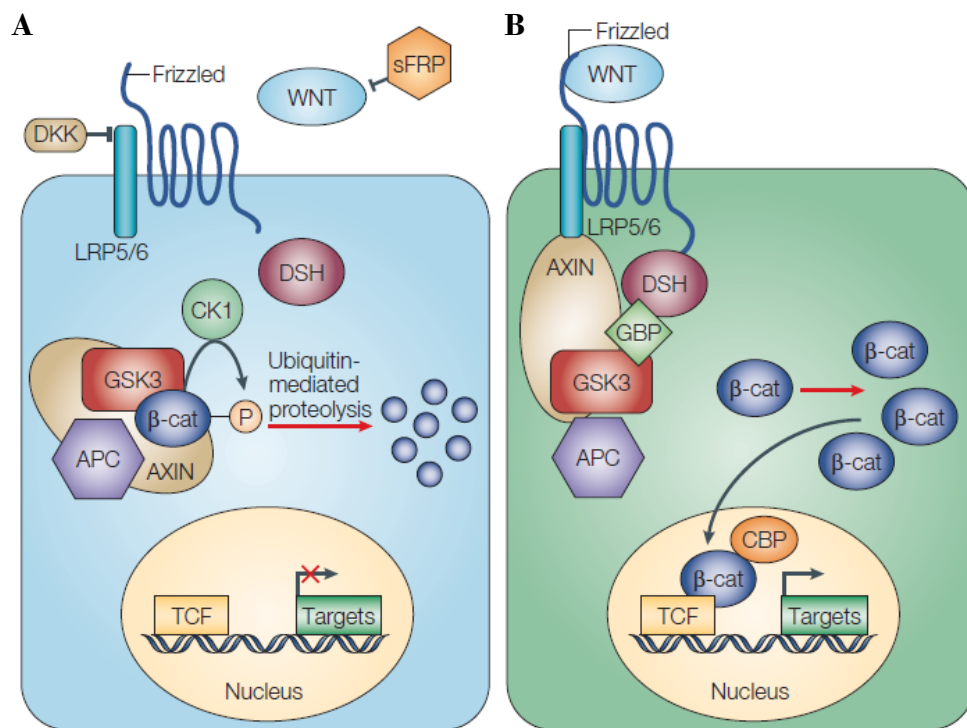
Le pool membranaire de  $\beta$ -caténine est stable. Dans des conditions physiologiques,  $\beta$ -caténine est liée à la glycoprotéine transmembranaire E-cadhérine qui est essentielle à l'adhésion cellulaire et aux jonctions intercellulaires, et également à  $\alpha$ -caténine par l'intermédiaire de laquelle elle interagit avec le cytosquelette d'actine (Jou *et al.*, 1995 ; Knudsen *et al.*, 1995) (Figure 26).



**Figure 26 :** Représentation de l'implication de  $\beta$ -caténine dans les jonctions adhérentes via son interaction avec E-cadhérine et  $\alpha$ -caténine (Kobiak and Fuchs, 2004).



Le pool cytoplasmique est en revanche instable. En absence de signal extracellulaire (Figure 27A), c'est-à-dire dans des conditions physiologiques, ce pool est maintenu à un niveau basal via la dégradation de  $\beta$ -caténine par la voie ubiquitine-protéasome.  $\beta$ -caténine est phosphorylée par l'action séquentielle de CK1 (Casein Kinase 1) (résidu sérine 45) et GSK-3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ ) (résidus thréonine 41, sérine 37 et sérine 33) (Liu *et al.*, 2002). Ces deux kinases font partie d'un complexe multi-protéiques dont font également partie APC (Adenomatous Polyposis Coli) et Axine (Bienz, 2005).  $\beta$ -caténine phosphorylée induit le recrutement de  $\beta$ -TrCP ( $\beta$  Transducin repeat Containing Protein), protéine initiateur du processus d'ubiquitinylation et de dégradation par le protéasome (Aberle *et al.*, 1997).



**Figure 27 :** Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.

**A)** En absence de ligand Wnt, la voie n'est pas active ;  $\beta$ -caténine est dégradée. **B)** En présence de ligand, la voie est activée,  $\beta$ -caténine n'est plus dégradée et les gènes cibles sont transcrits (Moon *et al.*, 2004).

Lorsqu'un ligand extracellulaire Wnt (grande famille de 16 glycoprotéines sécrétées, riches en cystéine) se lie au récepteur transmembranaire Frizzled (Fz), associé aux corécepteurs LRP5 (Mao *et al.*, 2001) ou LRP6 (Low density lipoprotein Receptor-related Protein) (He *et al.*, 2004), la voie Wnt est activée (Giles *et al.*, 2003) (Figure 27B). Le récepteur Frizzled activé induit la phosphorylation de la protéine cytoplasmique Dishevelled (Dsh) qui recrute ainsi la

protéine Axine à la membrane cellulaire. Ce recrutement provoque la dissociation du complexe APC-Axine-GSK-3 $\beta$ -CK1 et donc l'inhibition de la phosphorylation de  $\beta$ -caténine. Elle ne recrute ainsi plus  $\beta$ -TrCP et n'est plus être dégradée par le système ubiquitine-protéasome (Giles *et al.*, 2003).  $\beta$ -caténine libre s'accumule dans le cytosol et est ciblée dans le noyau par Pygopopus (Pygo), et Legless/BCL9 (Lgs) (Townesley *et al.*, 2004), où elle joue le rôle de cofacteur de transcription en se liant aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor) (Clevers and van de Wetering, 1997) (Figure 27B).  $\beta$ -caténine active ainsi la transcription de gènes cibles impliqués dans le destin et le contrôle de la prolifération cellulaire (Giles *et al.*, 2003).

#### 2.3.4.2 Structure de la protéine $\beta$ -caténine

Chez l'homme, le gène codant pour  $\beta$ -caténine, *CTNBI* (Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, MIM 116806<sup>9</sup>), est situé en 3p22-3p21 (van Hengel *et al.*, 1995).  $\beta$ -caténine est une protéine de 88 kDa constituée de 781 AA. L'extrémité N-Terminale, constituée d'environ 100 AA, contient les sites consensus de phosphorylation par GSK-3 $\beta$  (Yost *et al.*, 1996) et est le site de liaison pour  $\alpha$ -caténine (Aberle *et al.*, 1994 ; Hulsken *et al.*, 1994). Cette extrémité est donc très importante pour le contrôle du pool cytoplasmique de  $\beta$ -caténine (Munemitsu *et al.*, 1996). La région centrale, ou "arm repeats", contient les sites de liaison des cadhérines (Hulsken *et al.*, 1994), d'APC (Hulsken *et al.*, 1994) et des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (Behrens *et al.*, 1996), une partie du site de liaison d' $\alpha$ -caténine (Aberle *et al.*, 1996), et le site de liaison à EGF-R (Hoschuetzky *et al.*, 1994). L'extrémité C-Terminale contient le domaine de transactivation nécessaire à l'activation du complexe  $\beta$ -caténine/TCF et est donc importante pour la transcription des gènes cibles (Huber *et al.*, 1996) (Figure 28).

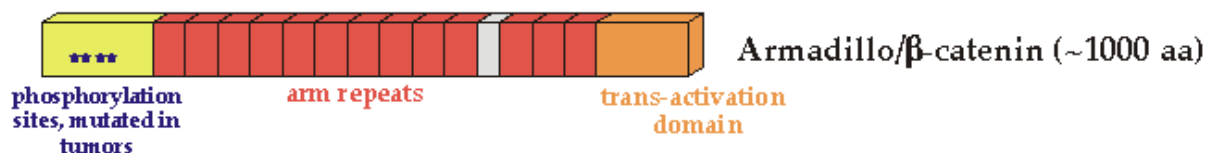


Figure 28 : Structure schématique de la protéine  $\beta$ -caténine<sup>10</sup>.

<sup>9</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=116806>

<sup>10</sup><http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>

### 2.3.4.3 Implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la tumorigenèse humaine

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine cible de nombreux gènes répertoriés sur le site internet de Roel Nusse<sup>10</sup> (Logan and Nusse, 2004). De manière non exhaustive, les principaux gènes cibles sont impliqués dans le développement (Mostowska *et al.*, 2006), le contrôle de la prolifération cellulaire (Anonymous, 1998), le contrôle du cycle cellulaire (Shtutman *et al.*, 1999), l'angiogenèse (Zhang *et al.*, 2001), l'invasion, la migration (Crawford *et al.*, 1999) ou la survie cellulaires (Zhang *et al.*, 2001).

De part ces nombreuses actions, une dérégulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine peut induire d'importantes modifications au sein des cellules, pouvant initier ou favoriser la tumorigenèse (Polakis, 2000 ; Giles *et al.*, 2003 ; Logan and Nusse, 2004). Des altérations génétiques de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine ont ainsi été initialement démontrées dans les cas de la Polypose Adénomateuse Familiale (syndrome de Gardner), puis décrites dans de nombreux autres types de cancers (Kikuchi, 2003). Ces altérations peuvent être des mutations du gène *apc* (adenomatous poliposis coli), l'inactivation de Axine ou encore des mutations de  $\beta$ -caténine (Polakis, 2007). Toutes ces altérations conduisent à l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le cytosol, ce qui a pour effet une activation constitutive de la voie Wnt. Alors que les mutations de *apc* sont spécifiques de l'épithélium colorectal, la dérégulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine/TCF est très impliquée dans la cancérogenèse humaine en général.

:

### 3. TUMEURS CORTICOSURRÉNALIENNES

Les tumeurs qui se développent au dépens du cortex surrénal, dites tumeurs corticosurrénales (TCS), font partie des tumeurs épithéliales. Les tumeurs malignes, ou carcinomes corticosurrénales (CCS), sont des cancers détectés généralement tardivement et aucun réel traitement efficace n'existe, particulièrement à des stades avancés (Kirschner, 2006). De mauvais pronostic, ces cancers restent cependant très rares. Les tumeurs bénignes, ou adénomes corticosurrénales (ACS), comptent en revanche parmi les tumeurs les plus fréquentes (Mansmann *et al.*, 2004).

#### 3.1 Épidémiologie

Avec une prévalence de 3 à 7% (Ross and Aron, 1990 ; Kloos *et al.*, 1995), les adénomes sont les tumeurs corticosurrénales les plus fréquentes. Il en existe deux types, les adénomes sécrétants et les adénomes non sécrétants ; ces derniers étant les plus fréquents (Tableau 6).

Adénomes corticosurrénaux non sécrétants	70%
Adénomes corticosurrénaux sécrétants	
Cortisol	9,2%
Aldostérone	1,4%
Phéochromocytomes (tumeurs de la médulla)	4,2%
Carcinomes corticosurrénaux	4,0%
Métastases	0,7%
Autres lésions (dont les AIMAH)	11,5%

**Tableau 6** : Classification des incidentalomes surrénaux.

D'après l'étude de 1 004 patients par le Study Group of the Italian Society of Endocrinology on Adrenal Incidentalomas (Mantero *et al.*, 2000).

Les carcinomes corticosurrénaux sont des cancers rares qui représentent moins de 1% de l'ensemble des cancers. Ils ont une incidence estimée de 0,5 à 2 cas par million par an chez l'adulte, en Amérique du Nord et en Europe (Sidhu *et al.*, 2003 ; Kebebew *et al.*, 2006), et sont responsables de 0,04 à 0,2% des décès par cancer (Kirschner, 2006). Les CCS ont une distribution d'âge bimodale : un pic d'incidence est observé chez les enfants de moins de cinq ans, puis un deuxième pic apparaît entre les 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> décennies. Chez les enfants,

l'incidence est cependant dix fois moindre, sauf dans le sud du Brésil qui présente la plus forte incidence de CCS pédiatriques, de l'ordre de 4 cas par million par an, récemment expliquée par une mutation germinale spécifique de l'exon 10 du gène *TP53* (Ribeiro *et al.*, 2001). Ces tumeurs, à tendance plus fréquente chez les femmes que chez les hommes (Luton *et al.*, 2000 ; Icard *et al.*, 2001), peuvent être sporadiques, plus rarement héréditaires.

## 3.2 Tumeurs corticosurréaliennes bénignes

### 3.2.1 Adénomes

Dans sa forme typique, l'adénome est une lésion nodulaire unique, de quelques millimètres à quelques centimètres. Généralement unilatéral, il dépasse rarement 5 cm de diamètre ou 50 g de poids. Il est bien limité, encapsulé, mais élargit le cortex surrénal (Figure 29). Les ACS sécrétants, lésions les plus fréquentes du cortex surrénal, sont classés en trois groupes :

➤ **Les adénomes produisant du cortisol** : ils se révèlent par un syndrome de Cushing. Celui-ci comprend une prise de poids avec obésité facio-tronculaire, une atrophie cutanée, une érythrose faciale, des troubles de la cicatrisation, une atrophie musculaire, des troubles psychiques, une hypertension artérielle, un diabète, une ostéoporose, des infections opportunistes et un hirsutisme ;

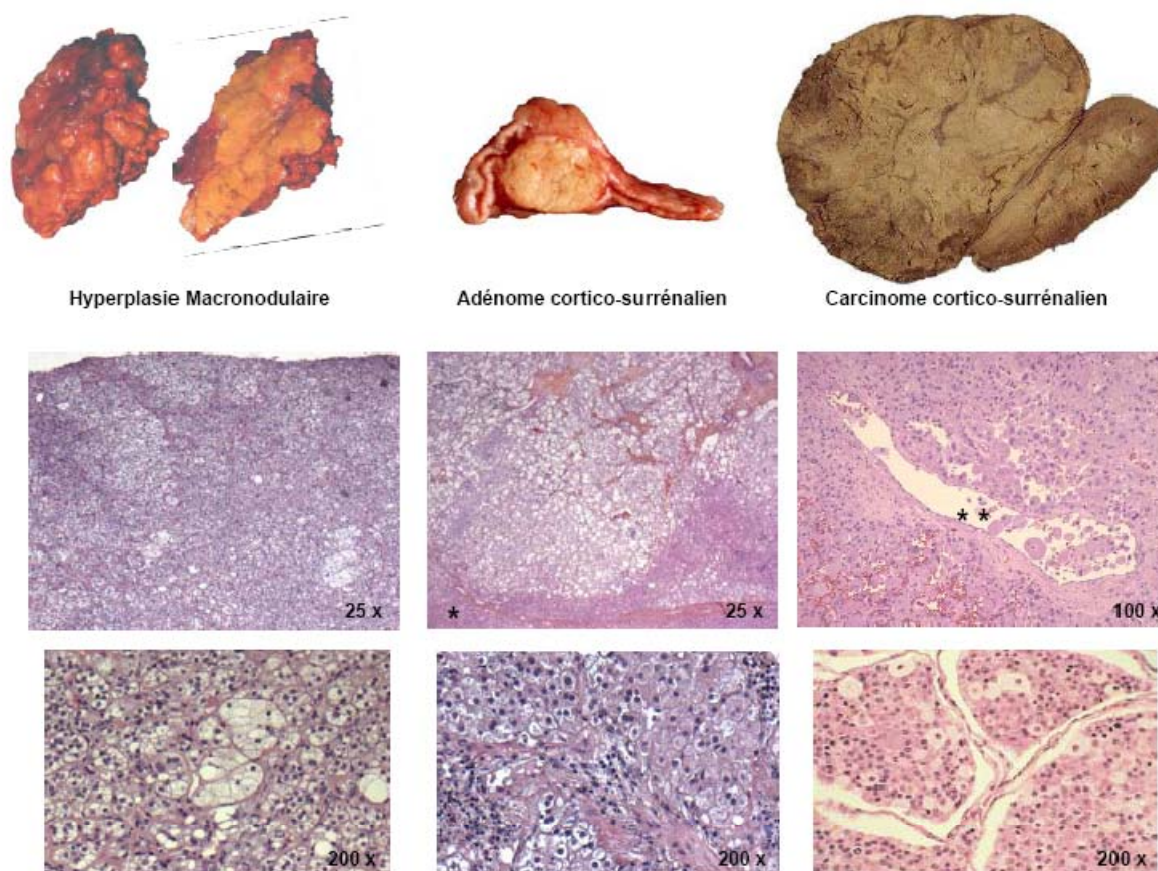
➤ **Les adénomes sécrétant des androgènes ou des œstrogènes** : ces ACS sont rares car les tumeurs sécrétant des hormones sexuelles sont le plus souvent malignes. Les symptômes observés sont en rapport avec un excès d'androgènes chez la femme : hirsutisme, aménorrhée et virilisation. Chez l'homme, ils sont en rapport avec un excès d'œstrogènes : gynécomastie et impuissance ;

➤ **Les adénomes produisant de l'aldostérone** : il s'agit des adénomes de Conn.

### 3.2.2 Hyperplasie macronodulaire

L'hyperplasie macronodulaire, souvent bilatérale, est caractérisée par une augmentation globale, à l'aspect polylobée, des surrénales (Figure 29). Cette lésion bénigne, beaucoup plus rare que l'adénome (Tableau 6), peut être à l'origine d'un hypercorticisme indépendant de l'ACTH. Dans ce cas, elle est appelée hyperplasie surrénalienne bilatérale macronodulaire ou AIMAH (ACTH-Independent bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia) (Lieberman *et al.*, 1994). L'AIMAH est une anomalie plutôt sporadique, qui exhibe des manifestations cliniques

aux alentours de la 5<sup>ème</sup> ou 6<sup>ème</sup> décennie. De rares cas familiaux ont cependant été décrits (Findlay *et al.*, 1993 ; Minami *et al.*, 1996).



**Figure 29** : Exemples macro- et microscopiques de lésions tumorales typiques du cortex surrénal.

Coloration Hématoxyline & Éosine : dans l'**hyperplasie**, les cellules claires sont arrangées en “nodules” ; l'**adénome** est bien encapsulé (tissu fibreux rougeâtre) et le tissu corticosurrénalien normal (\*) est comprimé par l'adénome ; le **carcinome** présente une invasion de cellules néoplasiques dans le lit vasculaire (\*\*) et un faible contingent de cellules claires.

### 3.2.3 Aspects anatomo-pathologiques

La coloration de l'adénome varie du jaune vif au beige. Dans les formes cortisoliques, la surrénale résiduelle et celle controlatérale sont atrophiques. A l'examen histologique, les adénomes sont constitués de cellules semblables à celles qui siègent dans le cortex surrénal normal : cellules de grande taille, au cytoplasme clair, microvacuolisé et riche en lipide, conférant un aspect spongiocytaire aux cellules. Il peut exister un certain degré de pléiomorphisme cellulaire : les cellules sont alors “compactes”, au cytoplasme éosinophile, pauvre en lipides. Les noyaux sont petits, arrondis ou ovalaires, généralement réguliers. Par endroit, ils peuvent être augmentés de volume et hyperchromatiques, mais l'indice mitotique

reste bas. Le tissu interstitiel est peu abondant et bien vascularisé. Les ACS sont circonscrits par une condensation fibreuse parfois mal visible (Figure 29).

Dans l'AIMAH, comme dans le cas des adénomes, on retrouve des cellules d'aspect microvacuolaire ou spongiocytaire, impliquées dans le métabolisme des stéroïdes. Ces éléments s'organisent cependant en cordons de cellules compactes avec des amas de cellules claires, exhibant plusieurs degrés d'hyperplasie cellulaire et distribués comme des nodules dans le cortex (Figure 29). Les zones inter-nodulaires sont souvent atrophiques (Swain *et al.*, 1998). La différenciation tumorale, le pléomorphisme nucléaire peu fréquent et l'absence de nécrose sont en faveur de la bénignité.

### 3.2.4 Syndromes héréditaires

Quelques rares syndromes héréditaires sont à l'origine de lésions surrénaliennes bénignes :

➤ **L'hyperplasie macronodulaire bilatérale** liée à des mutations activatrices du gène *GNAS* (Guanine Nucleotide-binding protein, Alpha-Stimulating) codant pour la sous-unité  $\alpha$  de la protéine Gs ( $Gs\alpha$ ). Ces mutations ont été décrites soit dans le cadre du syndrome de McCune-Albright (MAS), un syndrome de pathologies génétiques pédiatriques (Weinstein *et al.*, 1991 ; Lumbroso *et al.*, 2002), soit en absence de manifestations de ce syndrome (Fragoso *et al.*, 2003) ;

➤ **La dysplasie micronodulaire pigmentée ou PPNAD** (Primary Pigmented Nodular Adrenal Disease), parfois à l'origine de syndromes de Cushing ACTH-indépendants, généralement chez les enfants et les jeunes adultes. Cette pathologie est due à une mutation inactivatrice du gène *PRKARIA* (locus 17q22-24) codant pour la sous-unité régulatrice R1 $\alpha$  de la PKA (cAMP-dépendant, regulatory, type 1, alpha). La PPNAD est une des principales manifestations cliniques du complexe de Carney (CNC) (Carney *et al.*, 1985), un syndrome héréditaire dominant caractérisé par l'association de myxomes cardiaques, d'anomalies de la pigmentation cutanée et d'un hyperfonctionnement endocrinien (Kirschner *et al.*, 2000a ; Groussin *et al.*, 2005). Des mutations germinales inactivatrices et hétérozygotes de *PRKARIA* ont été démontrées dans 45 à 65% des familles CNC (Kirschner *et al.*, 2000b ; Veugelers *et al.*, 2004) ;

➤ **L'hyperplasie congénitale des surrénales**, l'une des plus fréquentes endocrinopathies chez l'enfant (1 sur 5000 naissances) caractérisée, dans 95% des cas, par un déficit enzymatique de la 21-hydroxylase (P450c21) (Charmandari *et al.*, 2004). C'est l'hypersécrétion d'ACTH, liée à une absence de rétrocontrôle par le cortisol, qui stimule cette hyperplasie ;

➤ **La Néoplasie Endocrine Multiple de Type 1 (NEM1)**, un syndrome autosomique dominant caractérisé par des tumeurs multiples de la glande parathyroïde, du pancréas ou de l'hypophyse antérieure (Thakker, 1998). Une mutation inactivatrice, germinale et hétérozygote du gène *MEN1* codant pour la ménine (locus 11q13) est retrouvée dans 90% des familles affectées par cette pathologie (Pannett and Thakker, 2001). Des hyperplasies et des adénomes non sécrétants sont observés dans 55% des cas (Kjellman *et al.*, 1999 ; Barzon *et al.*, 2001b). Plus rarement, le carcinome corticosurrénalien peut faire partie du tableau clinique (Skogseid *et al.*, 1992).

### 3.3 Carcinome corticosurrénalien

#### 3.3.1 Aspects cliniques

Le plus souvent, les manifestations cliniques des CCS sporadiques sont associées à une hypersécrétion hormonale de glucocorticoïdes et d'androgènes (Tableau 6). L'hypersécrétion de glucocorticoïdes est responsable d'un syndrome de Cushing, pouvant, exclusivement chez la femme, être associé à une virilisation liée à un excès d'androgènes. La sécrétion pure d'androgènes est beaucoup plus rare. Exceptionnellement, certaines tumeurs sécrètent des œstrogènes et peuvent provoquer une gynécomastie chez l'homme ou des métrorragies chez la femme ménopausée (Luton *et al.*, 1990 ; Icard *et al.*, 2001 ; Abiven *et al.*, 2006 ; Allolio and Fassnacht, 2006). Les excès de minéralocorticoïdes sont rares ; seuls onze cas ont été rapportés dans la littérature.

Alors que certaines études rapportaient que près de 50% des CCS étaient sécrétants, des études plus récentes ont montré que les carcinomes sont sécrétants dans plus de 79% des cas. Cette différence est certainement due à l'amélioration des techniques de dosage (Dackiw *et al.*, 2001 ; Tauchmanova *et al.*, 2004). Cependant, cette classification est simpliste car nombreux sont les CCS qui peuvent sécréter plusieurs types d'hormones et dont la sécrétion peut évoluer en fonction de la taille, du taux de croissance, et de la différenciation.



Certains carcinomes corticosurrénaux peuvent ne présenter aucun signe clinique endocrinien spécifique (Tableau 6). Il s'agit alors de CCS qui n'ont aucune activité hormonale anormale ou qui sécrètent des stéroïdes non bio-actifs, tels que des précurseurs, en particulier la 17-hydroxy-progesterone (Bonacci *et al.*, 1998 ; Kendrick *et al.*, 2001).

Dans les années 80, Karakousis *et al.* (1985) avançait que les tumeurs sécrétantes étaient de meilleur pronostic que les tumeurs non sécrétantes. Ces résultats étaient certainement dus au fait que les tumeurs sécrétantes peuvent être détectées plus tôt que les autres en raison des signes endocriniens qu'elles engendrent. En 2004, une revue a prouvé le contraire en analysant 58 patients suivis depuis 1980 : les tumeurs non sécrétantes sont de meilleur pronostic (Chen *et al.*, 2004).

Le pronostic des CCS est relativement dévastateur – la survie à cinq ans estimée à 20% (Demeure and Somberg, 1998 ; Icard *et al.*, 2001) - car la thérapeutique de ces cancers est limitée et insuffisante. Depuis 1960, le seul traitement médical existant est le Mitotane<sup>®</sup> (Op'DDD), dérivatif du pesticide DDT (Bergental *et al.*, 1960). Pouvant provoquer une véritable surrénalectomie chimique de part son action adrénolytique, le Mitotane<sup>®</sup> est cependant peu efficace sur les formes “avancées” de CCS présentant une invasion locale et des métastases à distance (Kirschner, 2006). Environ 22% des patients seulement répondent et leur survie est augmentée de 14 à 50 mois (Decker *et al.*, 1991). La meilleure chance de guérison est donc une résection totale d'une forme “localisée” (Barzilay and Pazianos, 1989) ; le Mitotane<sup>®</sup> pouvant alors constituer une option comme traitement adjuvant à la chirurgie.

### 3.3.2 Aspects anatomo-pathologiques

Le carcinome corticosurrénal est généralement une tumeur volumineuse (Figure 29), pesant plus de 100 g (Saeger and Fassnacht, 2006) et mesurant plus de 6 cm (Ross and Aron, 1990). Il peut dépasser 20 cm de diamètre (Figure 29), mais, au moment du diagnostic, la taille moyenne des CCS est de 10 cm (Dackiw *et al.*, 2001).

De couleur jaune orangé à beige rosé, le CCS est souvent hétérogène, avec des zones friables, hémorragiques ou de kystisation. Mal encapsulé, il peut adhérer aux structures adjacentes ou infiltrer les organes adjacents. Ce sont des tumeurs classiquement hypervascularisées et nécrotiques, et des cellules tumorales libres sont fréquentes dans les vaisseaux (Figure 29). De haute malignité, les carcinomes corticosurrénaux envahissent la veine surrénale, la veine cave et la surrénale opposée. Les métastases ganglionnaires régionales sont habituelles

et les métastases viscérales, et pulmonaires, apparaissent rapidement (Didolkar *et al.*, 1981). Au moment du diagnostic, 30 à 40% des patients présentent déjà des signes de dissémination métastatique (Dackiw *et al.*, 2001) (Tableau 6).

Au niveau microscopique, les carcinomes corticosurrénaux sont organisés en large travées, en nids, en structure alvéolaires ou en plages diffuses. Ils sont principalement constitués de cellules compactes ; les cellules spongiocytaires sont rares. Il existe un pléiomorphisme nucléaire marqué avec des nucléoles bien visibles (Figure 29). Des mitoses, parfois anormales, sont généralement observées mais leur nombre varie considérablement. Le stroma des CCS est constitué par un fin réseau de sinusoides auxquels peuvent s'adjoindre, en périphérie des travées carcinomateuses, des bandes fibreuses.

### 3.3.3 Syndromes héréditaires

Les carcinomes corticosurrénaux sont généralement sporadiques. Ils sont cependant parfois associés à des syndromes génétiques héréditaires tels que le syndrome de Li-Fraumeni, le syndrome de Beckwith-Wiedemann ou encore la Néoplasie Endocrine Multiple Type 1 (NEM1, cf. § 3.2.4) :

➤ **Le syndrome de Li-Fraumeni (LFS)** (Li and Fraumeni, 1969) est un syndrome autosomique dominant qui prédispose à des tumeurs multiples, généralement avant l'âge de 30 ans. Ces tumeurs peuvent être des sarcomes des tissus mous, des tumeurs du sein, du cerveau, des leucémies ou des lymphomes (Hisada *et al.*, 1998). Des CCS surviennent chez 3 à 4% des personnes atteintes de LFS. Dans 70% des cas, des mutations germinales du gène suppresseur de tumeurs *TP53* sont à l'origine de ce syndrome (Malkin *et al.*, 1990). Fréquemment, ces mutations sont associées à une délétion de l'allèle sauvage *TP53* suite à une LOH (Loss Of Heterozygosity) sur le chromosome 17p13 (Latronico *et al.*, 2001 ; Ribeiro *et al.*, 2001). Des enfants avec des mutations germinales de *TP53* peuvent développer un CCS comme seule manifestation du syndrome de Li-Fraumeni (Latronico *et al.*, 2001) ;

➤ **Le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS)** est un syndrome autosomique dominant caractérisé par une hypercroissance fœtale, une taille excessive des organes internes et des anomalies de développement à la naissance, qui prédisposent à des tumeurs pédiatriques (Morison and Reeve, 1998) telles que la tumeur rénale de Wilms, un hépatoblastome, un rhabdomyosarcome ou un CCS (Gicquel *et al.*, 1997 ; Maher and Reik, 2000). Ce syndrome est très étroitement lié à des modifications génétiques ou épigénétiques

de la région 11p15 : les modifications génétiques sont en générale une isodisomie paternelle ou une mutation germinale du gène *CDKN1C* (p57<sup>Kip2</sup>) (Lam *et al.*, 1999) ; les modifications épigénétiques consistent en une hyperméthylation isolée de l'antioncogène *H19* ou en une déméthylation isolée de *KCNQ1* (Reik *et al.*, 2000 ; Gaston *et al.*, 2001 ; Arney, 2003 ; Yang *et al.*, 2003). Le BWS est généralement sporadique, mais dans de rares cas familiaux, la perte de l'empreinte de *IGF-2* peut être due à une délétion des sites de liaison à CTCF au niveau de l'IC1 maternel (Sparago *et al.*, 2004 ; Prawitt *et al.*, 2005) (cf. § 2.3.3.3).

### 3.4 Circonstances de découverte des lésions tumorales corticosurrénales

D'une manière générale, les circonstances de découverte des TCS se répartissent entre l'investigation d'un trouble endocrinien ou d'une douleur abdominale, la présence de masses palpables ou de métastases. Des masses corticosurrénales sans signes cliniques apparents peuvent également être mises en évidence par des techniques d'imagerie telles que l'échographie, la tomographie ou l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), réalisées pour des raisons autres qu'une pathologie endocrinienne (Bertherat *et al.*, 2002). Ceci définit les incidentalomes surrénaux et l'utilisation accrue de ces méthodes d'imagerie, de plus en plus performantes, révèle actuellement leur haute prévalence (Copeland, 1983 ; Chidiac and Aron, 1997 ; Mansmann *et al.*, 2004). Dans la majorité des cas, il s'agit de lésions bénignes avec hypersécrétion hormonale "sous-clinique", mais parfois aussi de tumeurs malignes (Tableau 6).

En général, la découverte de CCS fait suite à la manifestation clinique d'une hypersécrétion hormonale de glucocorticoïdes et d'androgènes (Tableau 6). Les formes "non sécrétantes" de CCS sont, quant à elles, révélées par des manifestations tumorales loco-régionales, voire métastatiques. Le syndrome tumoral, en cas de tumeur volumineuse, est représenté par des douleurs du flanc en rapport avec une compression locale et des signes généraux, de la fièvre par exemple, en rapport avec la nécrose tumorale. Plus rarement, les CCS peuvent être découverts lors de l'exploration d'un incidentalome surrénal. Bien que cette situation ne soit pas la plus fréquente, elle occupe cependant une place de plus en plus importante dans la découverte de carcinomes corticosurrénaux (Luton *et al.*, 1990 ; Wajchenberg *et al.*, 2000).

### 3.5 Diagnostic et pronostic

Poser le diagnostic définitif d'une lésion tumorale corticosurrénale peut être un véritable défi. Il faut en effet considérer l'importance du diagnostic, notamment des incidentalomes, car malgré la rareté des CCS, il est toujours à craindre la malignité d'une lésion de la glande surrénale. Les tumeurs bénignes et malignes ayant un pronostic vital très différent, il est important pour les cliniciens d'être capables de les différencier le plus facilement possible afin de proposer aux patients, la prise en charge clinique la plus adéquate.

Deux types de critères ont longtemps été utilisés en temps que prédictors de la nature maligne des tumeurs corticosurrénales : le poids et la taille, et la combinaison de paramètres histologiques.

A l'origine, le poids et la taille étaient les critères de malignité les plus utilisés (Tang and Gray, 1975). La significativité de ces critères en tant que prédictors de la malignité a encore été confirmée récemment : en utilisant les seuils de 50 g pour le poids et 6,5 cm pour la taille, ces critères ont une sensibilité et une spécificité respectivement de 91 et 100% chez l'adulte (Harrison *et al.*, 1999 ; Aubert *et al.*, 2002). L'utilisation de techniques d'imagerie permettant d'identifier des nodules de plus en plus petits remet cependant en question le rôle de la taille dans la prédiction de la malignité (Barnett *et al.*, 2000 ; Stojadinovic *et al.*, 2002 ; Stojadinovic *et al.*, 2003).

Ces simples critères morphologiques ne permettent cependant pas de poser un diagnostic définitif et non équivoque de la malignité. Pour cette raison, plusieurs systèmes utilisant une combinaison de paramètres histologiques ont été proposés (Hough *et al.*, 1979 ; Weiss, 1984 ; van Slooten *et al.*, 1985 ; Aubert *et al.*, 2002). En 1984 par exemple, Weiss a défini neuf critères strictement histologiques détaillés dans le Tableau 7, en étudiant 43 tumeurs du cortex surrénal. Chaque critère vaut 1 lorsqu'il est présent et 0 lorsqu'il est absent ; le score final est obtenu en additionnant les valeurs des neuf critères. A l'époque, la valeur prédictive des scores était : 0 à 2 = tumeur bénigne ; 3 = pronostic indéterminé ; 4 à 9 = tumeur maligne. En 1989, cette échelle a été modifiée. Depuis, il est admis qu'un score au dessus de 3 est plus que vraisemblablement indicateur de la nature maligne de la tumeur (Weiss *et al.*, 1989).

1	Grade nucléaire de III ou IV selon la gradation établie par Fuhrman <i>et al.</i> (1982) ➤ Grade III : noyaux de contours irréguliers, diamètre de 20 µm, nucléole apparent ➤ Grade IV : aspect proche du grade III mais noyaux polylobés, chromatine hypercondensée
2	Indice mitotique supérieur à 5/50 champs (grossissement x40)
3	Présence de mitoses atypiques
4	Proportion de cellules à cytoplasme clair ou microvacuolisé inférieur à 25% de la population néoplasique
5	Architecture diffuse de plus de 1/3
6	Nécrose
7	Envahissement des veines
8	Envahissement des sinusoides
9	Invasion de la capsule

Tableau 7 : Critères positifs émis par Weiss pour l'évaluation pronostique des tumeurs corticosurrénales. D'après Weiss, 1984.

Bien que la classification de Weiss soit encore très utilisée, cette approche anatomo-pathologique pose l'inconvénient d'être soumise à la subjectivité de l'interprétation de certains critères. En pratique quotidienne, il est donc parfois difficile d'établir un diagnostic certain et une meilleure compréhension de l'importance de chaque critère est absolument nécessaire. Dans cette optique, la grande majorité des publications faite sur les critères de diagnostic des CCS présente l'indice mitotique comme étant le critère le plus fiable. Il a en outre été montré que cet indice et la présence de mitoses atypiques sont des critères très significativement corrélés au caractère malin, et à la survie (Assie *et al.*, 2007).

Actuellement, le diagnostic de malignité repose donc principalement sur des investigations histologiques, cliniques et d'imagerie avant résection. Seuls des progrès dans la compréhension de la physiopathologie des TCS - notamment des altérations génétiques impliquées - permettront d'améliorer le diagnostic, l'évaluation du pronostic et de développer des traitements efficaces (Stratakis, 2003). Des avancées récentes dans la génétique des CCS ont d'ores et déjà mis en avant certains acteurs moléculaires qui offrent des outils diagnostiques et pronostiques sans doute meilleurs que les seules appréciations classiques du score de Weiss. Ceux-ci seront cités par la suite, au fur et à mesure de la description des altérations génétiques des TCS sporadiques.

## 4. TUMORIGENÈSE CORTICOSURRÉNALIENNE

---

### 4.1 Étude de la clonalité

L'étude de la clonalité de tumeurs est une étape importante dans la compréhension de l'origine cellulaire des néoplasmes et des mécanismes impliqués dans la progression tumorale. La polyclonalité indique que les cellules tumorales sont les cibles de stimuli locaux ou systémiques. La monoclonalité des tumeurs est en revanche la conséquence d'altérations conférant un avantage prolifératif à une cellule initialement affectée qui devient tumorale suite à l'accumulation d'autres altérations génétiques (Knudson, 1996). Ces dernières induisent, par exemple, la surexpression de proto-oncogènes, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou l'altération de protéines impliquées dans la progression normale vers la sénescence, ou l'apoptose.

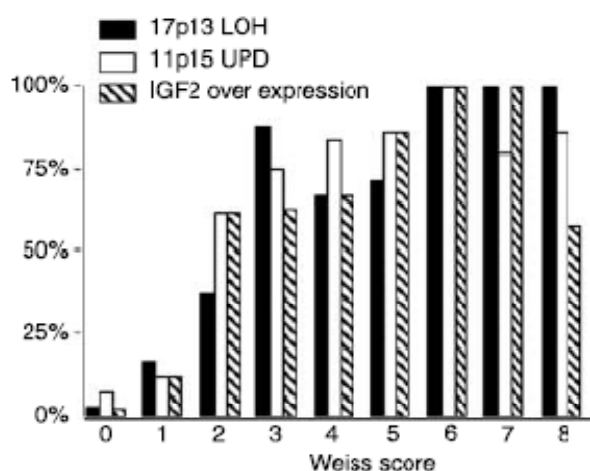
Des données d'analyses clonales par inactivation du chromosome X ont démontré que 60 à 100% des TCS consistent en une population monoclonale de cellules (Beuschlein *et al.*, 1994 ; Gicquel *et al.*, 1994b), alors que la majorité des tissus hyperplasiques (77 à 100%) est formée par des populations polyclonales (Gicquel *et al.*, 1994b ; Diaz-Cano *et al.*, 2000). Les adénomes peuvent être mono- ou polyclonaux (Beuschlein *et al.*, 1994 ; Gicquel *et al.*, 1994b ; Diaz-Cano *et al.*, 2000). Cette hétérogénéité génétique des adénomes pourrait être la résultante de mécanismes pathologiques distincts ou représenter des stades différents d'un processus tumoral multi-étapes. Dans ce dernier cas de figure, l'hypothèse serait donc qu'une tumeur maligne se développerait à partir d'une cellule ayant acquis un avantage prolifératif au sein d'un agrégat polyclonal présent dans les tumeurs bénignes (Beuschlein *et al.*, 1994 ; Gicquel *et al.*, 1994b ; Koch *et al.*, 2002 ; Libé and Bertherat, 2005). Cet avantage prolifératif serait lié à un événement génétique rare, au vu de la fréquence beaucoup plus importante des ACS par rapport aux CCS.

## 4.2 Aberrations génomiques

Les altérations de la régulation et de l'expression de gènes sont nombreuses dans les cancers, et c'est également le cas pour les TCS. Des erreurs de réplication peuvent conduire à des aberrations chromosomiques numériques, des translocations, des amplifications ou des pertes de gènes. Une étape importante dans l'analyse des TCS a été l'étude de leur clonalité (cf. § 4.1). Des analyses plus approfondies, incluant l'hybridation génomique comparative (CGH ; Comparative Genomic Hybridisation) ou l'analyse de marqueurs microsatellites, ont ensuite mis en évidence des altérations génomiques affectant différents chromosomes et loci, plus fréquentes dans les CCS que dans les ACS et hyperplasies.

Dans les CCS, de fréquents gains sont observés sur les chromosomes 4, 5, 12, 15q, 16q et 19, alors que des pertes sont fréquemment trouvées sur les chromosomes 1q, 2, 11q, 17p, 22p et 22q (Yano *et al.*, 1989 ; Sidhu *et al.*, 2002). Kjellman *et al.* (1996) corrélaient le nombre d'aberrations chromosomiques détectées par CGH à la taille de la tumeur ; aucune altération n'a été observée dans des adénomes de moins de 5 cm, alors que les CCS de 7 à 20 cm présentent des altérations dans plus de 50% des cas. Ces résultats ont été confirmés par d'autres travaux (Zhao *et al.*, 1999 ; Dohna *et al.*, 2000 ; Sidhu *et al.*, 2002). Dans le cas des adénomes, la CGH a révélé des gains fréquents sur les chromosomes 4, 5, 12 et 19, et des pertes sur les chromosomes 1p, 2q, 11q, 17p, 22p, et 22q (Kjellman *et al.*, 1996 ; Sidhu *et al.*, 2003).

Les aberrations chromosomiques peuvent également être mises en évidence par des pertes d'hétérozygotie (LOH). Ces études ont notamment analysé les loci liés aux syndromes familiaux associés à des TCS. L'analyse de l'ADN par Southern Blot ou de ses marqueurs microsatellites par PCR (Polymerase Chain Reaction) a ainsi démontré un fort pourcentage de LOH en 11q13 (NEM1) (Kjellman *et al.*, 1999 ; Schulte *et al.*, 2000), en 2p16 (CNC) (Kjellman *et al.*, 1999), en 17p13 (LFS) (Gicquel *et al.*, 2001), en 17q23-24 (CNC) (Bertherat *et al.*, 2003) et en 11p15 (BWS) (Gicquel *et al.*, 1997) dans les CCS. Les LOH des régions 11p15 et 17p13, peu fréquentes pour 11p15 voire absentes pour 17p13 dans les ACS, sont associées à des risques importants de récurrence et sont corrélées au score de Weiss (Yano *et al.*, 1989 ; Gicquel *et al.*, 2001) (Figure 30).



**Figure 30** : Fréquence de la LOH du locus 17p13 (17p13 LOH), de l'isodisomie paternelle du locus 11p15 (11p15 UDP) et de la surexpression de IGF-2, en fonction du score de Weiss (Libé *et al.*, 2007a).

### 4.3 Altérations génétiques des TCS sporadiques

Les défauts moléculaires des syndromes familiaux associés à des tumeurs corticosurrénaliennes ont été bien caractérisés, comme cité précédemment (cf. § 3.2.4 et § 3.3.3). L'analyse des altérations des gènes impliqués dans ces syndromes a ainsi constitué une base pour l'étude des TCS sporadiques. De ce fait, le locus 11p15 et ses gènes (*IGF-2*, *p57<sup>Kip2</sup>* et *H19*), et les gènes *TP53*, *MEN1* ou *PRKARIA* ont été étudiés en premier lieu. De nombreuses autres altérations, indépendantes des syndromes familiaux, ont également été découvertes (Koch *et al.*, 2002 ; Sidhu *et al.*, 2003 ; Stratakis, 2003 ; Sidhu *et al.*, 2004 ; Bertherat and Gimenez-Roqueplo, 2005 ; Libé and Bertherat, 2005 ; Kirschner, 2006 ; Libé *et al.*, 2007a ; Volante *et al.*, 2008) (Tableau 8). Il est à noter que si les altérations génétiques des TCS sporadiques sont de mieux en mieux connues, il reste, aujourd'hui encore, difficile de replacer ces altérations dans le contexte de la formation et de la progression tumorale.



### 4.3.1 Altérations en rapport avec les syndromes héréditaires

#### 4.3.1.1 Locus 11p15

Le syndrome de Beckwith-Wiedemann (cf. § 3.3.3) a révélé l'importance du locus 11p15 et de ses gènes dans la tumorigenèse corticosurrénalienn. Des réarrangements chromosomiques, des LOH ou des modifications de l'empreinte parentale du locus 11p15, résultant en une expression diminuée de *CDKN1C* (*p57<sup>KIP2</sup>*) et *H19*, et une surexpression de *IGF-2* ont également été largement décrits dans les TCS sporadiques (Gicquel *et al.*, 1994a ; Gicquel *et al.*, 1997).

#### ❖ IGF-2

Dans le cortex surrénal normal, IGF-1 et IGF-2 sont tous les deux impliqués dans la croissance et les fonctions différenciées ; ils induisent la stéroïdogénèse des cellules corticosurréniennes, à la fois *in vivo* et *in vitro*.

Le rôle du système IGF a également été largement documenté dans les TCS (Mesiano *et al.*, 1993 ; Gicquel *et al.*, 2001). Alors que *IGF-1* n'est jamais surexprimé (Boulle *et al.*, 1998), des analyses transcriptomiques de TCS ont montré que ***IGF-2*** est le gène le plus fortement surexprimé dans les carcinomes, en comparaison des tissus normaux ou bénins (Giordano *et al.*, 2003 ; Bourdeau *et al.*, 2004 ; de Fraipont *et al.*, 2005). Les effets de la surexpression de IGF-2 sont cependant restreints à la tumeur, car le taux plasmatique de ce facteur de croissance ne varie pas. *In vivo*, les cellules NCI-H295R (Logié *et al.*, 2000), issues d'un CCS humain (Rainey *et al.*, 1994), et les CCS qui surexpriment IGF-2 possèdent un taux élevé de IGFBP-2 corrélé au stade tumoral (Boulle *et al.*, 1998 ; Boulle *et al.*, 2000). Ceci suggère donc que IGFBP-2 régulerait les effets de IGF-2 dans les CCS. IGF1-R, récepteur par lequel IGF-2 médie ses effets mitogéniques (Logié *et al.*, 1999), est également très fortement surexprimé dans les carcinomes (Weber *et al.*, 1997a).

La surexpression de IGF-2, en plus d'être la plus importante des surexpressions dans les CCS, est l'anomalie la plus fréquemment retrouvée, approximativement dans 90% des cas (Ilvesmaki *et al.*, 1993b ; Gicquel *et al.*, 1997 ; Boulle *et al.*, 2001). Une LOH du locus 11p15 conduisant à une isodisomie paternelle est fréquemment à l'origine de cette anomalie (Gicquel *et al.*, 1994a) (cf. § 2.3.3.3 ; Figure 25). Moins souvent, la cause est une perte de l'empreinte (Rainier *et al.*, 1993), avec maintenance des deux allèles parentaux mais avec un profil d'expression paternel (Gicquel *et al.*, 1997 ; Libé and Bertherat, 2005) (cf. § 2.3.3.3 ; Figure 24).

❖ CDKN1C (p57<sup>KIP2</sup>)

L'ARNm de **CDKN1C** (p57<sup>KIP2</sup>) est facilement détecté par Northern Blot dans les surrénales saines et toutes les tumeurs présentant un niveau d'expression normal de IGF-2. Il existe en revanche une diminution de l'expression de ce gène dans les CCS surexprimant IGF-2 et dans les cellules NCI-H295R (Bourcigaux *et al.*, 2000). Les mutations somatiques de **CDKN1C** sont rares et ne sont donc pas responsables de la diminution des taux d'ARNm et protéique dans les CCS. La LOH ou des modifications de l'empreinte du locus 11p15 seraient plutôt à l'origine de cette diminution (Barzon *et al.*, 2001a).

p57<sup>KIP2</sup>, en tant qu'inhibiteur des Cdk, est un régulateur négatif du cycle cellulaire. Une fonction réduite ou absente de cette protéine conduirait donc à une stimulation de l'activité des complexes cycline/Cdk de la phase G1, avec possible stimulation de la prolifération (Bourcigaux *et al.*, 2000).

## ❖ H19

Dans les CCS avec isodisomie paternelle, l'expression du gène **H19** est pratiquement toujours abolie (Gicquel *et al.*, 1997). La méthylation de son promoteur est impliquée dans l'expression anormale à la fois de **H19** et de **IGF-2** dans les CCS humains (Gao *et al.*, 2002).

## 4.3.1.2 TP53

Le syndrome de Li-Fraumeni (cf. § 3.3.3) a identifié le rôle du gène **TP53** dans les carcinomes corticosurrénaux. Il semble que la mutation de ce gène soit un événement tardif dans le processus de tumorigenèse. En effet, des mutations somatiques de **TP53**, réparties entre les exons 5 et 8, sont retrouvées dans 25 à 33% des carcinomes chez l'adulte, alors qu'elles semblent absentes dans les adénomes de patients caucasiens (Ohgaki *et al.*, 1993 ; Reincke *et al.*, 1994 ; Sidhu *et al.*, 2005 ; Libé *et al.*, 2007b). Récemment, un groupe italien a cependant rapporté un taux de mutation de **TP53** dans 70% de dix CCS (Barzon *et al.*, 2001a) et en 1994, une équipe taïwanaise rapportait des mutations de **TP53** dans 73% des adénomes de patients Taïwanais, dont 82% de ces mutations étaient sur l'exon 4 (Lin *et al.*, 1994). Reincke *et al.* (1996) ont alors séquencé l'exon 4 dans 19 adénomes de patients caucasiens, mais aucune mutation n'a été retrouvée. Tout ceci suggère donc que les conditions environnementales joueraient un rôle important dans le type de mutations observées.

En règle générale, la majorité des mutations de *TP53* se produit dans le domaine de liaison à l'ADN. Plus rarement, les mutations peuvent survenir dans le domaine d'oligomérisation. Dans le cas particulier des CCS, la substitution du résidu histidine 337 par un résidu arginine (R337H), dans le domaine d'oligomérisation, est une mutation germinale fréquente chez les enfants atteints de CCS dans le sud du Brésil. Cette mutation dans l'exon 10 serait ainsi responsable de la multiplication par un facteur 10 de l'incidence des CCS pédiatriques dans cette région par rapport au reste du monde (Latronico *et al.*, 2001 ; Ribeiro *et al.*, 2001).

#### 4.3.1.3 MEN1

Des LOH du locus 11q13 sont retrouvées dans environ 20% des TCS sporadiques et 40% des patients atteints de NEM1 développent des TCS (cf. § 3.2.4). Le gène *MEN1* avait ainsi été pensé comme pouvant être un gène fondamental pour le processus de tumorigenèse corticosurrénalienne. La LOH du locus 11q13 est très fréquente dans les CCS – plus de 90% des cas – mais relativement rare dans les ACS – seulement 20 % des cas (Heppner *et al.*, 1999 ; Kjellman *et al.*, 1999 ; Schulte *et al.*, 2000). Les mutations de *MEN1* sont en revanche rares dans les CCS (Heppner *et al.*, 1999 ; Schulte *et al.*, 2000) et le niveau d'expression de ce gène est très similaire dans les CCS, ACS et tissus normaux. *MEN1* ne semble donc pas jouer un rôle très important dans la tumorigenèse corticosurrénalienne sporadique. Cependant, dans la mesure où les LOH dans les CCS impliquent presque tout le domaine 11q, il est probable qu'un gène suppresseur de tumeurs, pas encore identifié et situé sur le bras long du chromosome 11, soit impliqué dans la tumorigenèse corticosurrénalienne.

#### 4.3.1.4 Voie de signalisation AMPc

##### ❖ PRKAR1A

Le complexe de Carney (CNC) a permis de cibler le gène *PRKARIA*, composant clé de la voie de signalisation AMPc (Bertherat, 2001 ; Bossis and Stratakis, 2004) (cf. § 3.2.4). Un séquençage de ce gène a révélé des mutations inactivatrices, avec diminution subséquente des taux d'ARNm et de protéines, dans 10% d'adénomes sporadiques responsables d'un syndrome de Cushing et présentant les caractéristiques cliniques d'une PPNAD (Bertherat *et al.*, 2003). Aucune mutation n'a été retrouvée dans des CCS.

Des LOH au locus 17q22-24 ont été retrouvées dans des ACS sporadiques et semblent être limitées au locus de *PRKARIA*, suggérant l'implication possible de ce gène suppresseur de tumeurs dans l'initiation de la tumorigenèse corticosurrénalienne. En revanche, dans les CCS,

les LOH semblent affecter une plus grande partie du chromosome 17q, ce qui suggère que les altérations de *PRKARIA* jouent un rôle mineur dans la progression tumorale (Bertherat *et al.*, 2003).

#### ❖ GNAS

Impliquées dans le syndrome de McCune-Albright (MAS) (cf § 3.2.4), les mutations de *GNAS* sont rares dans les adénomes sporadiques : il a par exemple été rapporté un cas d'ACS sécrétant présentant une mutation activatrice de Gs $\alpha$  associée à une activation de la voie de l'AMPc (Yoshimoto *et al.*, 1993) ; des mutations de ce gènes ont également été décrites chez des patients atteints d'une AIMAH (Fragoso *et al.*, 2003). Aucune mutation n'a jamais été rapportée dans des carcinomes.

#### 4.3.2 Voie de signalisation ACTH/AMPc/PKA

La voie de signalisation ACTH/AMPc/PKA a été impliquée dans la tumorigenèse corticosurrénaliennes pour de multiples raisons. Il existe, par exemple, une corrélation entre la taille du cortex surrénal et le taux circulant d'ACTH chez des patients atteints d'une hyperplasie congénitale des surrénales ou d'une maladie de Cushing (Rosenberg *et al.*, 2002). De plus, comme décrit précédemment (cf. § 4.3.1.4), des patients atteints par le CNC ou le MAS sont porteurs, respectivement, de mutations dans les gènes *PRKARIA* ou *GNAS*, composants importants de la voie AMPc (Kirschner *et al.*, 2000a ; Lumbroso *et al.*, 2002).

En ce qui concerne le récepteur de l'ACTH, **MC2R**, aucune mutation activatrice n'a été retrouvée dans 25 adénomes, 13 carcinomes et 8 hyperplasies (Latronico *et al.*, 1995 ; Light *et al.*, 1995 ; Fragoso *et al.*, 2003). En revanche, l'expression de *MC2R* semble être régulée positivement dans les adénomes sécrétants et diminuée dans les ACS non sécrétants et les CCS (Reincke *et al.*, 1997 ; Reincke *et al.*, 1998). Des LOH de *MC2R* (locus 18p11.2) ont été retrouvées dans 2 CCS sur 4, mais dans aucun des 15 adénomes hypersécrétants étudiés (Reincke *et al.*, 1997). Toutes ces études suggèrent que MC2R est plus impliqué dans la différenciation cellulaire que dans l'initiation tumorale. La perte de l'expression de ce gène engendrerait une dédifférenciation en favorisant l'expansion clonale (Latronico, 2000) et semble être liée à des tumeurs corticosurrénaliennes plus agressives (Reincke *et al.*, 1997).

Dans cette même optique de dédifférenciation associée à la malignité, il a été démontré que le facteur de transcription CREB est sous-exprimé dans des carcinomes et des adénomes non-sécrétants du cortex surrénal (Rosenberg *et al.*, 2003), tumeurs considérées moins différenciées que les adénomes fonctionnels et les hyperplasies.

### 4.3.3 Gènes classiquement impliqués dans la tumorigenèse humaine

#### 4.3.3.1 Ras

Concernant l'implication de **Ras** dans les TCS, les données de la littérature se contredisent. En 1998, Lin *et al.* ont mis en évidence des mutations de *K-Ras* dans 6 sur 13 adénomes de Conn, mais aucune mutation de *H-Ras*. En revanche, Moul *et al.* (1993), et Ocker *et al.* (2000) n'ont identifié, dans des tumeurs bénignes ou malignes, aucune mutation de *N-Ras*, *H-Ras* ou *K-Ras* dans les codons 12, 13 ou 61, où se trouvent habituellement les mutations de *Ras* dans les tumeurs humaines. Les mutations mises en évidence par l'équipe taïwanaise (Lin *et al.*, 1998b) sont localisées dans des codons non décrits précédemment, ce qui pourrait être spécifique de ce groupe populationnel asiatique. Finalement, la plus grande cohorte de 62 lésions tumorales corticosurréaliennes a démontré des mutations activatrices de *N-Ras* dans le codon 61, avec une prévalence identique de 12,5% dans les groupes de 24 carcinomes et 32 adénomes, mutations absentes dans les 6 hyperplasies étudiées. La grande majorité des patients était d'origine américaine ; les 12 adénomes issus de patients japonais ne présentaient pas de mutations (Yashiro *et al.*, 1994).

#### 4.3.3.2 Wnt/ $\beta$ -caténine

Jusqu'aux travaux de Tissier *et al.*, en 2005, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine n'avait jamais été étudiée de manière très approfondie dans les tumeurs corticosurréaliennes. En analysant cette voie de signalisation dans 26 adénomes et 13 carcinomes, cette équipe a mis en évidence une accumulation nucléaire et/ou cytoplasmique de  $\beta$ -caténine dans 38% des adénomes et 77% des carcinomes, et  $\beta$ -caténine a été retrouvée mutée uniquement dans les tumeurs présentant une immunolocalisation anormale de cette protéine, mais avec une fréquence similaire entre les deux types de tumeurs : 27% pour les ACS et 31% pour les CCS (Tissier *et al.*, 2005). Cette prévalence équivalente entre ACS et CCS suggère que la mutation de  $\beta$ -caténine est un événement précoce dans la tumorigenèse corticosurréalienn et commun aux adénomes et carcinomes.

Dans la mesure où la localisation de  $\beta$ -caténine est plus souvent anormale dans les CCS que dans les ACS et que les mutations ont une fréquence équivalente entre ces deux groupes, un autre composant clé de la voie Wnt, tel que APC ou Axine, doit contribuer à la pathogénicité des tumeurs corticosurréaliennes. Des patients porteurs d'une polypose adénomateuse familiale avec mutation germinale du gène *apc*, qui induit une inactivation de la voie Wnt, peuvent en effet développer des TCS (Blaker *et al.*, 2004).

#### 4.3.3.3 Acteurs du cycle cellulaire

**CDKN2A** est un gène suppresseur de tumeurs, situé sur le locus 9p21, qui code pour p16<sup>INK4</sup>, inhibiteur de Cdk4 (Beuschlein *et al.*, 1994 ; Kamb *et al.*, 1994). D'après Yano *et al.* (1989), 50 à 85% des lignées cellulaires dérivées de tumeurs humaines possèdent des lésions bi-alléliques de ce gène. En 1999, Pilon *et al.* ont montré, par immunohistochimie (IHC), la perte d'un allèle et l'absence de protéine p16<sup>INK4</sup> dans 1 ACS sur 7, et 3 CCS sur 7.

**CDKN1A** code pour p21<sup>CIP1</sup>, un autre inhibiteur de Cdk très important pour le contrôle du cycle cellulaire. p21<sup>CIP1</sup> est sous-exprimé dans 70% des CCS (Iida *et al.*, 1997 ; Stojadinovic *et al.*, 2002), mais d'après Iida *et al.* (1997), la diminution de l'expression de p21<sup>CIP1</sup> n'affecterait pas le pronostic.

Ces études, associées à celles réalisées sur *CDKN1C* (cf. § 4.3.1.1), suggèrent que les inhibiteurs de Cdk ont un rôle dans la tumorigenèse de certaines tumeurs uniquement.

La surexpression de la **cycline E**, cycline indispensable à la progression de la phase G1 et au passage en phase S, est associée à la malignité (Giordano *et al.*, 2003) et est très corrélée à la taille de la tumeur, au score de Weiss, à la présence d'aberrations génomiques telles que la LOH en 17p13, et à la surexpression de *IGF-2* (Bourcigaux *et al.*, 2000 ; Tissier *et al.*, 2004).

#### 4.3.3.4 hTERT

L'activité télomérase, absente des cellules somatiques normales, est réactivée dans près de 90% des tumeurs malignes humaines (Kim *et al.*, 1994 ; Shay *et al.*, 2001). C'est également le cas dans les carcinomes corticosurréaliens (Kinoshita *et al.*, 1998 ; Bamberger *et al.*, 1999 ; Mannelli *et al.*, 2000 ; Sticchi *et al.*, 2006 ; Else *et al.*, 2008). La mise en évidence de la réactivation de l'activité télomérase, via la détection de hTERT, sous-unité catalytique de la télomérase humaine, a ainsi été proposée comme marqueur de malignité (Hirano *et al.*, 1998 ; Teng *et al.*, 1998 ; Kanauchi *et al.*, 2002).

#### 4.3.4 Facteurs de croissance

Divers facteurs de croissance et cytokines, autres que les IGF, régulent la croissance et le fonctionnement des surrénales fœtales, et adultes normales. Ces facteurs incluent FGF-2, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ -1 (Transforming Growth Factor  $\beta$  1), VEGF et les interleukines (Hotta and Baird, 1986 ; Feige *et al.*, 1991 ; Ilvesmaki *et al.*, 1993a ; Weber *et al.*, 1997a ; Weber *et al.*, 1997b ; Feige *et al.*, 1998 ; de Fraipont *et al.*, 2000 ; Turner *et al.*, 2003).

**FGF-2**, très exprimé dans les tissus surrénaux, est le facteur mitogène le plus efficace en culture pour les cellules de surrénales adultes et fœtales (Mesiano *et al.*, 1991 ; Feige *et al.*, 1998). D'après Bouille *et al.* (2000), FGF-2 est également mitogène pour les cellules NCI-H295R et régule l'expression de *IGF-2* et *IGFBP-2*.

L'angiogenèse joue un rôle majeur dans la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Le statut angiogénique d'une tumeur peut être défini en étudiant l'expression du **VEGF**. Bien le taux de VEGF soit augmenté (de Fraipont *et al.*, 2000 ; Bernini *et al.*, 2002), il n'a été observée aucune association entre cette élévation et le niveau de vascularisation des CCS. Ceci suggère une dissociation entre le statut vasculaire et les capacités de néo-angiogenèse de ces tumeurs (Bernini *et al.*, 2002). Le taux plasmatique de VEGF est élevé chez les patients atteints de CCS (Kolomecki *et al.*, 2001). Cependant, bien qu'une réduction significative du taux plasmatique de VEGF soit observée un mois après la résection de carcinomes, son utilisation en tant que marqueur de malignité reste à être confirmée, et ce d'autant plus que le dosage du VEGF plasmatique est susceptible d'être faussé par une contamination de VEGF relargué par les plaquettes sanguines.

**TGF $\beta$ -1** inhibe la prolifération des cellules endothéliales et régule la croissance, et les fonctions des surrénales adulte et fœtale. Deux études montrent une expression diminuée de l'ARNm de TGF $\beta$ -1 dans les CCS, mais aucune différence d'expression ni mutation de TGF $\beta$ -1 n'ont été observées (Boccuzzi *et al.*, 1999 ; Arnaldi *et al.*, 2000).

EGF est un facteur de croissance très important. Par IHC, son récepteur, **EGF-R**, est trouvé surexprimé dans les tumeurs malignes et bénignes (Kamio *et al.*, 1990 ; Sasano *et al.*, 1994 ; Edgren *et al.*, 1997). En revanche, il n'est retrouvé aucune surexpression de **EGF** (Sasano *et al.*, 1994).

#### 4.3.5 Autres gènes potentiellement impliqués

Squamous cell carcinoma-related oncogene (**SCCRO**) est un nouveau gène impliqué dans le développement et notamment dans celui du cortex surrénal. Dans une étude récente de CCS murins (Sarkaria *et al.*, 2004), des taux élevés de SCCRO ont été retrouvés dans les ACS (94%) alors que des pertes ont été observées dans plus de 65% des CCS. Cette perte d'expression, corrélée à un mauvais pronostic, pourrait constituer un marqueur de dédifférenciation.

**AKR1B1** (cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase) intervient dans le métabolisme du glucose et joue un rôle protecteur contre les aldéhydes toxiques dérivés de la peroxydation des lipides et de la stéroïdogenèse, qui pourraient affecter la croissance cellulaire. L'expression de **AKR1B1** est très fortement diminuée dans les CCS par rapport aux tumeurs bénignes (Lefrancois-Martinez *et al.*, 2004) et de ce fait, cette diminution avait été suggérée comme étant associée à la malignité.

Les facteurs de transcription GATA se lient à des séquences consensus (A/T)GATA(A/G) dans les séquences promotrices des gènes et jouent un rôle important dans le contrôle du développement, de la prolifération cellulaire, et de la différenciation. Il a récemment été montré que les facteurs GATA-4 et GATA-6 sont exprimés de manière différentielle dans les néoplasmes corticosurrénaux. En particulier, **GATA-4**, pratiquement indétectable dans les surrénales normales adultes, est très abondant dans les CCS métastatiques ou récidivants (Barbosa *et al.*, 2004 ; Kiiveri *et al.*, 2004). **GATA-6** est en revanche très fortement surexprimé dans les adénomes sécrétant du cortisol (Kiiveri *et al.*, 2004). De plus, l'expression de ce facteur de transcription est inversement corrélée au score de Weiss : plus le score est élevé, plus l'expression de GATA-6 est faible (Kiiveri *et al.*, 2005). GATA-6 permettrait donc le maintien des formes bénignes, différenciées, des tumeurs corticosurrénales, ce qui est cohérent avec le fait qu'il est coexprimé avec SF-1 et P450c17, deux marqueurs de la stéroïdogenèse (Kiiveri *et al.*, 2005), et qu'il induit la transcription de la 3 $\beta$ -HSD (Bassett *et al.*, 2005). L'absence de GATA-6 et la surexpression de GATA-4 seraient donc des facteurs propices à la formation de TCS malignes.

Beuschlein *et al.* (2004) décrivent le nouveau rôle de l'**inhibine** et de l'**activine**, glycoprotéines dimériques de la famille des ligands TGF $\beta$ , dans la tumorigenèse corticosurrénalienne. L'activine est un peptide ubiquitaire ayant un effet proapoptotique sur le



cortex surrénal, alors que l'inhibine, facteur antiprolifératif, est principalement exprimée dans les gonades, le cortex surrénal et l'hypophyse. Elles sont connues pour avoir des fonctions autocrine et paracrine importantes pour la croissance et la différenciation. La présence des récepteurs de ces deux protéines a été montrée par IHC comme étant très forte dans les CCS. L'activine inhibe la prolifération, induit l'apoptose et module la sécrétion d'ACTH induite par le cortisol. *In vitro*, un traitement à l'activine de cellules de CCS inhibe la stéroïdogénèse de manière dose dépendante (Beuschlein *et al.*, 2004).

GÈNE/ PROTÉINE	LOCUS	ALTÉRATION	PRÉVALENCE	RÉFÉRENCE
<b>GÈNES SUPPRESSEURS DE TUMEURS</b>				
<b>TP53</b>	17p13	LOH de l'allèle sauvage dans le LFS	8/11	(Latronico <i>et al.</i> , 2001)
			5/6	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2001)
		LOH dans les TCS sporadiques	4/8 CCS	(Kjellman <i>et al.</i> , 1996)
			1/9	(Figueiredo <i>et al.</i> , 1999)
			1/12 CCS	(Zhao <i>et al.</i> , 1999)
			1/29	(Zhao <i>et al.</i> , 1999)
			11/13 CCS	(Gicquel <i>et al.</i> , 2001)
			23/36	(Gicquel <i>et al.</i> , 2001)
			6/6 CCS	(Wachenfeld <i>et al.</i> , 2001)
			1/23	(Wachenfeld <i>et al.</i> , 2001)
			0/18	(Ohgaki <i>et al.</i> , 1993)
			3/15 CCS	(Ohgaki <i>et al.</i> , 1993)
			5/13 CCS	(Reincke <i>et al.</i> , 1994)
			0/5	(Reincke <i>et al.</i> , 1994)
			11/15	(Lin <i>et al.</i> , 1994)
			0/19	(Reincke <i>et al.</i> , 1996)
			8/14 CCS	(Barzon <i>et al.</i> , 2001a)
		Gain chromosomique au locus 17	6/29	(Zhao <i>et al.</i> , 1999)
			3/12 CCS	(Zhao <i>et al.</i> , 1999)
			3/14 CCS	(Dohna <i>et al.</i> , 2000)
			3/8	(Dohna <i>et al.</i> , 2000)
<b>MEN1</b>	11q13	LOH de l'allèle sauvage dans la NEM1	1/1	(Beckers <i>et al.</i> , 1992)
			0/12	(Skogseid <i>et al.</i> , 1992)
			5/11	(Iida <i>et al.</i> , 1995)
		LOH du locus 11q13 dans les TCS sporadiques	7/33	(Gordon <i>et al.</i> , 1996)
			2/21	(Heppner <i>et al.</i> , 1999)
			5/5 CCS	(Heppner <i>et al.</i> , 1999)
			13/27 (11 CCS)	(Kjellman <i>et al.</i> , 1999)
			9/35	(Gortz <i>et al.</i> , 1999)
			5/26	(Wachenfeld <i>et al.</i> , 2001)
			6/8 CCS	(Wachenfeld <i>et al.</i> , 2001)
		Mutations somatiques dans les TCS sporadiques	1/14	(Schulte <i>et al.</i> , 1999)
			0/25	(Heppner <i>et al.</i> , 1999)
			0/7 CCS	(Heppner <i>et al.</i> , 1999)
			0/2	(Kjellman <i>et al.</i> , 1999)
			0/11 CCS	(Kjellman <i>et al.</i> , 1999)
			0/35	(Gortz <i>et al.</i> , 1999)
			1/14	(Schulte <i>et al.</i> , 2000)
		LOH dans les TCS sporadiques	3/8 CCS	(Kjellman <i>et al.</i> , 1996)
			2/9	(Figueiredo <i>et al.</i> , 1999)
			1/29	(Zhao <i>et al.</i> , 1999)
			3/12 CCS	(Zhao <i>et al.</i> , 1999)
			0/23	(Dohna <i>et al.</i> , 2000)
			32/94	(Gicquel <i>et al.</i> , 2001)
			15/18 CCS	(Gicquel <i>et al.</i> , 2001)
			0/61	(Barzon <i>et al.</i> , 2001a)
		Mutations somatiques dans les TCS sporadiques	6/6 CCS	(Liu <i>et al.</i> , 1997)
			3/10	(Liu <i>et al.</i> , 1997)
			5/9	(Barzon <i>et al.</i> , 2001a)
			10/11 CCS	(Barzon <i>et al.</i> , 2001a)
<b>p21</b>	6p21	Surexpression dans les TCS sporadiques	4/11 CCS	(Barzon <i>et al.</i> , 2001a)
			25/38 CCS	(Stojadinovic <i>et al.</i> , 2002)
<b>p16</b>	9p21	LOH et sous-expression dans les TCS sporadiques	1/7	(Pilon <i>et al.</i> , 1999)
			3/7 CCS	(Pilon <i>et al.</i> , 1999)

GÈNE/ PROTÉINE	LOCUS	ALTÉRATION	PRÉVALENCE	RÉFÉRENCE
ONCOGÈNES				
RET	10q11.2	Mutation somatique dans les TCS	1/23	(Lin <i>et al.</i> , 1998c)
Ras	1p13.2	Mutation somatique dans les TCS	0/33	(Ohgaki <i>et al.</i> , 1993)
	(N-Ras)		0/17	(Moul <i>et al.</i> , 1993)
	12p11.2		3/24 CCS	(Yashiro <i>et al.</i> , 1994)
	(K-Ras)		4/32	(Xu <i>et al.</i> , 2008)
	11p15.5		6/18	(Lin <i>et al.</i> , 1998b)
	(H-Ras)	0/18	(Lin <i>et al.</i> , 1998b)	
		Surexpression de K-Ras	6/18	(Lin <i>et al.</i> , 1998b)
FACTEURS DE CROISSANCE				
IGF-2	11p15.5	Surexpression dans les TCS sporadiques, avec duplication de l'allèle paternel	0/15	(Ilvesmaki <i>et al.</i> , 1993a)
			4/4 CCS	(Ilvesmaki <i>et al.</i> , 1993a)
			2/17	(Gicquel <i>et al.</i> , 1994a)
			5/6 CCS	(Gicquel <i>et al.</i> , 1994a)
			3/35	(Gicquel <i>et al.</i> , 1997)
			27/29 CCS	(Gicquel <i>et al.</i> , 1997)
			26/94	(Gicquel <i>et al.</i> , 2001)
EGF-R	7p12	Surexpression	15/18 CCS	(Gicquel <i>et al.</i> , 2001)
			63/64 CCS	(Kamio <i>et al.</i> , 1990)
			10/23	(Kamio <i>et al.</i> , 1990)
EGF	4q25	Expression	5/5	(Sasano <i>et al.</i> , 1994)
			0/26	(Sasano <i>et al.</i> , 1994)
TGFα	2p13	Surexpression	0/5 CCS	
			5/5 CCS	(Sasano <i>et al.</i> , 1994)
MOLÉCULES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL				
GNAS1	20q13.2	Mutations somatiques dans les TCS sporadiques	0/11	(Lyons <i>et al.</i> , 1990)
			4/4	(Weinstein <i>et al.</i> , 1991)
			0/18	(Reincke <i>et al.</i> , 1993)
			1/19	(Yoshimoto <i>et al.</i> , 1993)
			1/1	(Boston <i>et al.</i> , 1994)
			1/1	(Bugalho <i>et al.</i> , 2000)
			1/1	(Kobayashi <i>et al.</i> , 2000)
GNAI2	3p21	Mutations somatiques sporadiques	3/11	(Lyons <i>et al.</i> , 1990)
			0/18	(Reincke <i>et al.</i> , 1993)
			0/18	(Gicquel <i>et al.</i> , 1995)
MC2R	18p11.2	Mutations somatiques Délétion	0/16	(Light <i>et al.</i> , 1995)
			0/25	(Latronico <i>et al.</i> , 1995)
			2/4	(Reincke <i>et al.</i> , 1997)
			1/16	(Reincke <i>et al.</i> , 1997)
ATR1	3q21-25	Mutations somatiques Expression modérée à élevée	0/17	(Davies <i>et al.</i> , 1997)
			0/55	(Sachse <i>et al.</i> , 1997)
			0/1	(Sachse <i>et al.</i> , 1997)
			12/12	(Tanabe <i>et al.</i> , 1998)
			9/9	(Schubert <i>et al.</i> , 2001)
PRKARIA	17q22-24	LOH	2/2	(Kirschner <i>et al.</i> , 2000a)
		Activité stimulée par l'AMPc	3/3	(Kirschner <i>et al.</i> , 2000a)
PKC	17q22-23 (α) 13p21 (δ)	Activité normale	17/17	(Latronico <i>et al.</i> , 1994)

Tableau 8 : Altérations génétiques des tumeurs corticosurrénales sporadiques.

D'après Koch *et al.*, 2002.

#### 4.4 Études de puces à ADN

Récemment de nombreuses équipes ont entrepris de réaliser des expériences de puces à ADN afin d'établir les profils moléculaires des TCS, et d'éventuellement établir des profils distincts entre ACS et CCS. De telles études ont également permis de caractériser de nouveaux gènes qui pourraient avoir des intérêts dans le diagnostic, la pathogénicité et donc la thérapeutique des TCS.

L'ensemble des études de puces à ADN, détaillé par la suite (Giordano *et al.*, 2003 ; de Fraipont *et al.*, 2005 ; Velazquez-Fernandez *et al.*, 2005 ; Slater *et al.*, 2006), a confirmé la surexpression de *IGF-2* dans les CCS, montrée notamment par Gicquel *et al.* en 1994, et Sidhu *et al.* en 2003. Cette surexpression est donc l'anomalie la plus fréquemment retrouvée dans les CCS (Giordano *et al.*, 2003 ; de Fraipont *et al.*, 2005 ; Velazquez-Fernandez *et al.*, 2005 ; Slater *et al.*, 2006), ce qui corrèle avec les réarrangements de la région 11p15, très communs dans les tumeurs malignes et beaucoup plus rares dans les adénomes (Gicquel *et al.*, 1994a). Nombreuses sont donc les données qui permettent de penser que le réarrangement de la structure du locus 11p15 et/ou la surexpression de *IGF-2* doit être un événement tardif dans le processus multi-étapes de la tumorigenèse sporadique.

La première étude a été réalisée par **Giordano *et al.*** en 2003. Bien que n'ayant pas permis d'établir un profil différentiel entre adénomes (24 échantillons) et tissus sains (4 échantillons), cette étude a mis en évidence un certain nombre de différences significatives entre adénomes et carcinomes (62 échantillons).

Le gène codant pour **STK15** (ou *aurora2*) ressort de cette étude comme étant surexprimé de près de cinq fois dans les CCS par rapport aux ACS. Agissant au niveau des centrosomes, cette sérine-thréonine kinase pourrait jouer un rôle dans l'aneuploïdie fréquemment observée dans les CCS (Limon *et al.*, 1987 ; Mertens *et al.*, 1998).

Le transcrit de **Ang-2** (Angiopoïétine 2) est augmenté de quatre fois dans les CCS. L'angiopoïétine 2 agissant en synergie avec VEGF pour induire l'angiogenèse, cette augmentation suggère que l'angiogenèse est un facteur important de la tumorigenèse corticosurrénalienne. Les thérapies antiangiogènes développées pour d'autres types de cancer pourraient ainsi être efficaces sur les CCS.

Le gène **UbcH10** code pour E2-C, protéine qui catalyse la dégradation des cyclines A et B via le protéasome, permettant ainsi à la mitose de s'achever (Aristarkhov *et al.*, 1996). Le fait que ce gène soit surexprimé de manière significative dans les CCS laisse à penser qu'il jouerait le rôle de facteur proprolifératif dans la tumorigenèse corticosurrénalienn.

Enfin, **ENC-1** (Ectodermal-Neural Cortex 1), surexprimé dans les cancers colorectaux et cible du complexe  $\beta$ -caténine/TCF (Fujita *et al.*, 2001), ressort de cette étude comme étant également surexprimé dans les CCS. Ceci suggère qu'une signalisation Wnt aberrante pourrait jouer un rôle dans la tumorigenèse corticosurrénalienn, ce qui a par la suite été confirmé, notamment par les travaux de Tissier *et al.* (2005).

Dans une seconde étude menée en 2005 par **de Fraipont *et al.***, le profil d'expression de 230 gènes a été étudié sur 33 échantillons d'adénomes (score de Weiss  $\leq 3$ ) et 24 échantillons de carcinomes (score de Weiss  $\geq 4$ ). En ciblant spécifiquement des gènes liés à l'oncogenèse (187 des 230 gènes) et des gènes spécifiques de la glande surrénale (34 des 230 gènes), de Fraipont *et al.* ont identifié deux groupes de gènes, le "cluster IGF-2" et le "cluster de la stéroïdogénèse" qui, combinés, constituent de bons prédictors de la malignité, presque aussi efficaces que le score de Weiss. Un groupe de 22 gènes suffirait donc à prédire le caractère malin des TCS (Tableau 9).

Le "cluster IGF-2" est constitué de huit gènes surexprimés (Tableau 9). **FGF-R1** et **FGF-R4** sont des récepteurs de FGF-1 et FGF-2. Ces derniers, exprimés dans le cortex normal, sont les facteurs mitogènes les plus efficaces pour les cellules corticosurréaliennes adultes (Feige and Baird, 1991), de même que pour les NCI-H295R (Boulle *et al.*, 2000). Ils sont également connus pour induire la prolifération des cellules endothéliales et mésenchymateuses. La surexpression de FGF-R1 et FGF-R4 est donc probablement impliquée dans la prolifération et la vascularisation accrue des tumeurs corticosurréaliennes. Ces deux récepteurs pourraient ainsi constituer des cibles thérapeutiques potentielles pour les CCS, cancers généralement résistants aux agents antimitotiques classiques (Ahlman *et al.*, 2001).

**TGF $\beta$ -2** et **TGF $\beta$ -R1** sont deux autres gènes présents dans le "cluster IGF-2". TGF $\beta$ -1 est un facteur autocrine produit par les cellules corticosurréaliennes (Feige *et al.*, 1991 ; Feige *et al.*, 1998). Il n'a aucun effet sur la prolifération des cellules stéroïdogènes, mais inhibe très fortement leur activité stéroïdogène via la régulation négative de l'expression de *StAR* et *CYP17* (Perrin *et al.*, 1991 ; Brand *et al.*, 1998). Bien que TGF $\beta$ -2 ait été moins bien caractérisé dans ce type cellulaire, il est connu qu'il signale via les mêmes récepteurs que

TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -R1 et TGF $\beta$ -R2, et qu'il inhibe également la stéroïdogénèse. Il est donc possible que la surexpression de TGF $\beta$ -2 et de son récepteur TGF $\beta$ -R1 dans les CCS participe à la dédifférenciation de ces tumeurs.

Un autre gène de ce groupe est *KCNQ1OT1*, situé sur le locus 11p15. Comme cité précédemment (cf. § 2.3.3.2 ; Figure 22), il code pour un transcrit non traduit, certainement impliqué dans la régulation de l'empreinte parentale de la région 11p15. Il n'est pas surprenant de retrouver ce gène surexprimé, dans la mesure où la région 11p15 est un locus fréquemment soumis à des modifications de l'empreinte ou à des LOH dans les CCS (Gicquel *et al.*, 1994a ; Gicquel *et al.*, 1997).

GÈNE	PROTÉINE	LOCUS
“CLUSTER IGF-2”		
<i>IGF-2</i>	Insulin-like Growth Factor 2	11p15.5
<i>FGF-R1</i>	Fibroblast Growth Factor Receptor 1	8p11.2-p11.1
<i>FGF-R4</i>	Fibroblast Growth Factor Receptor 4	5q35.1-qter
<i>TGF<math>\beta</math>-2</i>	Transforming Growth Factor $\beta$ 2	1q41
<i>TGF<math>\beta</math>-R1</i>	TGF $\beta$ Receptor 1; ALK5	9q33-q34
<i>MST1R</i>	Macrophage-Stimulating protein-1 Receptor	3p21.3
<i>KCNQ1OT1</i>	KCNQ1 Overlapping Transcript 1; lit 1	11p15.5
<i>GAPD</i>	GAPDH	12p13.31-p13.1
“CLUSTER DE LA STÉROÏDOGÈNESE”		
<i>CYP11A</i>	Cytochrome P450scc	15q24.1
<i>CYP11B1</i>	Cytochrome P450c11	8q21
<i>CYP17</i>	Cytochrome P450c17	10q24.3
<i>CYP21A2</i>	Cytochrome P450c21	6p21.1
<i>HSD3B1</i>	3 $\beta$ -HSD	1q21.2
<i>StAR</i>	Steroidogenic Acute Regulatory	8p11.2
<i>INHAB</i>	Inhibine $\alpha$	2q33-q36
<i>CREM</i>	cAMP Responsive Element Modulator	10p12.1-11.2
<i>RB1</i>	Retinoblastoma protein 1	13q14.1-q14.2
<i>PPM1A</i>	Protein Phosphatase 1A, Pagnesium-dependant; protein phosphatase 2C $\alpha$	11q23.1
<i>NME1</i>	Nonmetastatic protein 23 (NM23); nucleotide diphosphate kinase A	17q21.3
<i>S100B</i>	S100 calcium-binding protein B	21q22.3
<i>TGF<math>\beta</math>-R3</i>	TGF $\beta$ Receptor 3	Qp22.1
<i>GPC3</i>	Glypican 3	Xq26

Tableau 9 : Récapitulatif des gènes discriminant les adénomes des carcinomes.

D'après de Fraipont *et al.*, 2005.

Quatorze gènes constituent le “cluster de la stéroïdogénèse” dont six codent pour des protéines ou des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse (Tableau 9) : *StAR*, *P450scc*, *P450c17*, *P450c21*, *P450c11* et *3 $\beta$ -HSD*. Le niveau d’expression de ces gènes explique certainement le profil stéroïdogénique des tumeurs.

Cette étude a également défini un autre groupe de 14 gènes permettant de séparer les CCS récidivants des CCS non récidivants (Tableau 10). Parmi ces gènes, il y a *ITGB2* qui code pour l’intégrine  $\beta$ 2 et le gène de la **Granzyme A** (*GZMA*). Ces surexpressions reflètent l’infiltration des tumeurs par des cellules immunitaires. Le statut inflammatoire des CCS pourrait donc être pris en compte avant la résection afin de prédire le risque d’évolution métastatique. En dépit du fait que les effecteurs immunitaires jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la croissance tumorale, en conditions normales ou en réponse à une thérapie, il est évident que les cellules tumorales peuvent survivre à un assaut du système immunitaire. Plusieurs mécanismes permettant aux cellules tumorales de devenir résistantes au système immunitaire ont été suggérés, tels que la diminution de l’expression d’antigènes tumoraux à la surface des cellules ou la production de cytokines immunosuppressives par les cellules malignes (Mocellin *et al.*, 2004). La diminution du complexe majeur d’histocompatibilité de classe 2 et l’altération du système de ligand FAS/FAS dans les néoplasmes surrénaliens pourrait aider à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l’échappement à la réponse immunitaire (Wolkersdorfer *et al.*, 2005).

GÈNE	PROTÉINE	LOCUS
<i>ISGF3G</i>	Interferon-Stimulated transcription Factor 3 $\gamma$	14q11.2
<i>IL2RG</i>	IL-2 Receptor $\gamma$	Xq13
<i>GZMA</i>	Granzyme A	5q11-q12
<i>PTPN-2</i>	Protein Tyrosine Phosphatase, nonreceptor type 2	18p11.3-p11.2
<i>ITGB2</i>	Integrin $\beta$ 2	21q22.3
<i>ATF-1</i>	Activating Transcription Factor 1	12q13
<i>GAPD</i>	GAPDH	12p13.31-p13.1
<i>ACTG-1</i>	Actin $\gamma$ 1	17q25.3
<i>TLN-1</i>	Talin 1	9p
<i>PRKCSH</i>	Protein Kinase C Substrate 80K-H	19p13.2-13.1
<i>VIL2</i>	Vilin 2	6q25-q26
<i>ECN1</i>	Endothelin-Convertin enzyme 1	1p36.1
<i>CDKN2A</i>	Cyclin-Dependant Kinase inhibitor 2A; p16 <sup>INK4</sup>	9p21
<i>FOS</i>	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	14q24.3

Tableau 10 : Liste des gènes discriminant les tumeurs récidivantes des tumeurs non récidivantes.  
D’après de Fraipont *et al.*, 2005.

Également en 2005, **Velazquez-Fernandez *et al.*** ont étudié le profil d'expression de 9 670 gènes au sein de 13 ACS de moins de 5 cm et 7 CCS de plus de 7 cm. Il en est ressorti 571 gènes, 273 surexprimés et 298 réprimés, dont l'expression est significativement différente entre ACS et CCS. Ces 571 gènes sont principalement répartis sur les chromosomes 12 et 5 pour les gènes surexprimés, et sur les chromosomes 2 et 1 pour les gènes réprimés, ce qui corrèle aux études de CGH (Kjellman *et al.*, 1996 ; Dohna *et al.*, 2000 ; Sidhu *et al.*, 2002).

Les deux gènes les plus surexprimés (au moins 40 fois) sont *USP4* (Ubiquitin-Specific Protease 4) et *UFDIL* (Ubiquitin Fusion Degradation 1 Like). *USP4* est un proto-oncogène situé sur le chromosome 3p21.3, dont la surexpression est associée à la transformation maligne des petites cellules des adénocarcinomes, *in vitro* et *in vivo* (Gray *et al.*, 1995). *UFDIL* est situé sur le locus 22q11.21. Le produit de ce gène participe à la dégradation de protéines ubiquitinyllées impliquées dans le remodelage de la chromatine (Amati *et al.*, 2003). Bien que le rôle précis de *UFDIL* reste à être précisé, l'inhibition de protéines du système ubiquitine-protéasome a été suggérée comme nouvelle stratégie thérapeutique pour les cancers humains.

Plusieurs membres de la famille des IGF (IGF-2, IGF2-R, IGFBP-3 et IGFBP-6) font également partie des 15 gènes les plus significativement surexprimés. *IGF2-R* est situé sur le chromosome 6q25-q27 et est considéré comme un gène suppresseur de tumeurs. Ce gène code pour un récepteur non mitogénique qui cible IGF-2 dans les liposomes pour la dégradation, contrôlant ainsi l'effet prolifératif de IGF-2. La surexpression de son gène dans cette étude est donc contradictoire avec ce rôle suppresseur de tumeurs. Des études ont cependant montré des taux de transcrits aberrants associés à différentes mutations de IGF2-R dans le développement de carcinomes hépatiques ou gastriques, ainsi que dans les néoplasmes corticosurrénaux (Leboulleux *et al.*, 2001). *IGFBP-6* est également surexprimée dans les CCS, ce qui avait déjà été montré pour les carcinomes de la thyroïde (Aldred *et al.*, 2004) et des testicules (Hoei-Hansen *et al.*, 2004). La surexpression de *IGFBP-3* est plus faible. Ce gène est situé en 7p14-p12 et son produit agit comme transporteur de IGF-2, et donc comme inhibiteur de son action. Une corrélation négative a été rapportée entre le risque de cancer et le taux de IGFBP-3 (Deal *et al.*, 2001 ; Oh *et al.*, 2004).

Parmi les gènes réprimés dans les CCS par rapport aux ACS, il y a *CXCL10* [Chemokine (C-X-C motif) Ligand-10]. Il est situé sur le locus 4q21 et code pour une cytokine modulant l'angiogenèse et l'inflammation. *RARRES2* (Retinoïc Acid Receptor Responder 2), *ALDH1A1* (Aldehyde Dehydrogenase 1 family, member A1), *CYBRD1* (Cytochrome b



Reductase 1) et **GSTA4** (Glutathione S-Transférase A4) sont quatre autres gènes régulés négativement et impliqués dans le métabolisme cellulaire. Enfin, cette étude fait ressortir **CDH2** (neuronal Cadherin 2, type 1, Ncadherin), gène situé sur le locus 18q11.2 et codant pour une molécule des jonctions cellulaires. Ce gène a déjà été rapporté comme étant mis sous silence par des modifications épigénétiques et donc sous-exprimé dans les cancers pancréatiques (Hagihara *et al.*, 2004).

Enfin, en 2006, **Slater et al.** ont étudié le profil différentiel de 115 000 gènes connus comme étant importants pour le développement et la progression tumorale, afin de voir si des combinaisons de gènes peuvent prédire des tumeurs malignes. De l'étude de ces gènes sur 10 ACS, 10 CCS et 10 échantillons normaux, il n'en est ressorti que quatre dont l'expression est modifiée de manière importante (4 fois) entre adénomes et tissus sains, alors que 42 gènes sont modifiés entre tissus normaux et carcinomes, et 21 entre adénomes et carcinomes (Slater *et al.*, 2006).

De cette étude ressort plus particulièrement trois protéines dérégulées à la fois dans les ACS et les CCS. La **CgB** (chromogranin B) est une protéine présente dans les cellules endocrines de différents organes. Elle est régulée négativement 28 fois dans les ACS et 13 fois dans les CCS, ce qui suggère que cette protéine aurait une fonction suppressive de tumeurs dont la perte jouerait un rôle important dans les premières étapes de la tumorigenèse. Une étude précédente avait montré qu'une faible quantité de CgB est corrélée au pronostic des carcinomes de la thyroïde (Scopsi *et al.*, 1998). **Egr-1** (Early Growth Response 1) est un autre potentiel gène suppresseur de tumeurs. D'après cette étude, il est sous-exprimé dans les CCS de 8 et 3 fois par rapport, respectivement, aux ACS et tissus sains. Il s'agit d'un facteur de transcription souvent associé à la stimulation de la croissance cellulaire (Gashler and Sukhatme, 1995). Également connu sous le nom de NGFI-A (Nerve Growth Factor Induced-A), il est situé sur le "cytokine cluster" du chromosome 5 et a été proposé comme un gène central dans la bascule de l'expression de gènes impliqués dans la réponse à divers stress (Gashler and Sukhatme, 1995). La protéine p53 est connue pour activer l'expression de *Egr-1*, et ce facteur a précédemment été montré comme étant impliqué dans le développement et la maintenance des cancers de la prostate (Abdulkadir *et al.*, 2001 ; Adamson and Mercola, 2002).

De l'ensemble de ces études sont donc ressorties de longues listes de gènes exprimés de manière différentielle entre adénomes et carcinomes. Ces listes sont très différentes d'une étude à l'autre, le seul point commun entre elles étant la très forte surexpression de *IGF-2* dans les carcinomes. La disparité de ces résultats s'explique notamment par l'utilisation d'un nombre souvent limité d'échantillons en raison de la faible incidence des tumeurs corticosurréaliennes et plus particulièrement des tumeurs malignes. L'utilisation de plateformes et d'algorithmes différents, et le choix des gènes ciblés au départ peuvent également expliquer cette diversité des résultats.

La confirmation par des méthodes de biologie moléculaire ou d'immunohistochimie est une étape indispensable à la validation de la variation de l'expression de ces gènes. Quoi qu'il en soit, et même si des recherches plus approfondies doivent être menées sur certains de ces gènes, ces expériences de puces à ADN offrent de nombreuses perspectives, car les gènes révélés par ces études pourraient être impliqués dans l'initiation ou la progression tumorale, être des marqueurs moléculaires de malignité et/ou de récidives, ou encore être des cibles thérapeutiques.



## 5. MODÈLES DE TUMORIGENÈSE CORTICOSURRÉNALIENNE

Bien que les carcinomes corticosurrénaux soient rares, ce sont des tumeurs malignes de très mauvais pronostic, et ceci d'autant plus qu'il existe un réel manque de thérapies efficaces. L'établissement de nouvelles thérapies a été pendant longtemps limité par l'absence de modèles animaux de tumorigenèse corticosurrénalienne. Au cours de la dernière décennie, plusieurs équipes ont ainsi tenté de développer des modèles.

### 5.1 Xénotransplantation de cellules NCI-H295R

En 2000, Logié *et al.* ont développé un modèle de xénotransplantation de cellules NCI-H295R (Rainey *et al.*, 1994) chez des souris nude. *In vitro*, cette lignée cellulaire présente la même anomalie de surexpression de IGF-2 que les tumeurs corticosurrénales humaines (Logié *et al.*, 1999) et les caractéristiques typiques des cellules tumorales (immortalité, perte de l'inhibition de contact, indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, croissance indépendante du support) (Rainey *et al.*, 1994). *In vivo*, les tumeurs formées à partir de ces cellules injectées dans le flanc des souris reproduisent les caractéristiques des tumeurs humaines et sont histologiquement semblables à la tumeur initiale à partir de laquelle la lignée a été dérivée (Gazdar *et al.*, 1990). La xénotransplantation de NCI-H295R apparaît ainsi comme étant un bon modèle de carcinomes corticosurrénaux, pour deux raisons majeures :

- Les tumeurs reproduisent la dérégulation du système IGF et notamment la surexpression de IGF-2 (Boulle *et al.*, 1998) retrouvée dans les tumeurs malignes et le taux plasmatique de IGF-2 ne varie pas, comme chez l'homme (Gicquel *et al.*, 1994a) ;
- Les greffons produisent des stéroïdes et hypersécrètent IGFBP-2, également surexprimée dans les ACC (Boulle *et al.*, 1998).

Ce modèle représente un moyen intéressant de tester de nouvelles thérapies, principalement des thérapies ciblant les facteurs de croissance. Il ne renseigne cependant en rien sur la formation et l'évolutivité des TCS. Par ailleurs, le site de transplantation sous-cutanée a probablement induit une sélection de cellules exprimant un phénotype particulier par rapport à la population générale et de ce fait, les tumeurs résultantes représentent un sous-type particulier. Enfin, le profil des stéroïdes sécrétés par le xénotransplant est difficile à analyser car les souris n'ont pas été surrénalectomisées au moment de l'implantation.

## 5.2 LHR et facteurs GATA

### 5.2.1 Souris sauvages gonadectomisées

Plusieurs modèles murins sauvages présentent un profil de néoplasies surrénaliennes de type gonadique (Matzuk *et al.*, 1994 ; Bielinska *et al.*, 2006), après gonadectomie. L'ablation des gonades dérégule le rétrocontrôle négatif de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Les souris gonadectomisées présentent ainsi un fort taux plasmatique d'hormone lutéinisante (LH). Cette élévation chronique de LH est indispensable à la formation de la tumeur, car des études sur les souris NU/J nude ont révélé que la transplantation de cellules produisant de la gonadotrophine chorionique humaine (HCG) conduit à la formation de tumeurs corticosurrénaliennes, sans gonadectomie (Bielinska *et al.*, 2005). Ceci suggère que c'est en effet l'élévation du taux de LH et non la suppression de facteurs gonadiques suite à une gonadectomie qui induit la tumorigenèse du cortex surrénal, par induction de la surexpression ectopique du récepteur de la LH (LHR). Cependant, toutes les lignées murines ne développent pas de néoplasies corticosurrénaliennes en réponse à une gonadectomie ; seules les lignées DBJA/2J, NU/J nude et C3H développent des adénomes, et la lignée CE, des carcinomes (Bielinska *et al.*, 2005). La susceptibilité différentielle des lignées, en fonction du fond génétique, n'est pas encore très claire ; elle a cependant été liée à un polymorphisme du gène *SF-1* (Frigeri *et al.*, 2002). Ces réponses différentes en fonction du fond génétique indiquent donc que la surexpression ectopique de LHR est une réponse non spécifique qui n'induit pas directement la tumorigenèse. Il doit exister une autre cause, en aval de la voie LHR, à l'origine des tumeurs corticosurrénaliennes post-gonadectomie. Les facteurs de transcription de la famille GATA sont probablement impliqués, car il a été montré que le facteur GATA-4 est coexprimé avec LHR dans ces modèles murins (Bielinska *et al.*, 2003), et un lien fonctionnel entre LHR et GATA dans la physiopathologie des surrénales a récemment été proposé : une surexpression de LHR et de GATA-4, et une sous-expression de GATA-6 ont été décrites dans des ACS (Parviainen *et al.*, 2007 ; Vuorenoja *et al.*, 2007).

### 5.2.2 Souris transgéniques gonadectomisées

Des souris transgéniques invalidées pour le gène de l'inhibine, souris *inhibine*  $\alpha^{-/-}$  ou des souris exprimant l'antigène T de SV40 sous le contrôle du promoteur de l'inhibine  $\alpha$  (souris *Inha/Tag*), développent des carcinomes corticosurrénaliens dépendants des gonadotrophines, en réponse à une gonadectomie (Matzuk *et al.*, 1994 ; Kananen *et al.*, 1996).

L'inhibine est une protéine à effet suppresseur de tumeurs. Sa suppression, dans le modèle *inhibine*  $\alpha^{-/-}$  induit le développement de tumeurs gonadiques qui produisent des taux élevés d'activine, dont l'action proapoptotique sur le cortex surrénal prévient la formation de tumeurs (Matzuk *et al.*, 1994 ; Beuschlein *et al.*, 2003 ; Looyenga and Hammer, 2006). Lorsque ces souris sont gonadectomisées, l'action simultanée de la suppression de l'activine gonadique, de l'élévation de la LH et de l'abolition de l'effet antiprolifératif de l'inhibine conduit à la formation de tumeurs corticosurréaliennes. Ces dernières expriment GATA-4, n'expriment plus GATA-6 et comportent deux types de cellules avec des profils d'expression différents, ressemblant soit aux cellules de la thèque, soit aux cellules de la granulosa des ovaires (Looyenga and Hammer, 2006).

Chez les souris *Inha/Tag*, les CCS sont formés en conséquence de l'effet combiné de l'antigène T de SV40 (SV40-T) et du taux élevé de LH induit par la gonadectomie (Kastan *et al.*, 1991 ; Rilianawati *et al.*, 1998). Les tumeurs expriment, de manière abondante et homogène, le facteur de transcription GATA-4 (Kiiveri *et al.*, 1999 ; Rahman *et al.*, 2004). Le récepteur LHR est également surexprimé, selon le même profil d'expression que GATA-4, et GATA-6 est sous-exprimé (Rahman *et al.*, 2004).

### 5.2.3 Pertinence de ces modèles

Dans tous ces modèles murins, la gonadectomie provoque une augmentation du récepteur de la LH. GATA-4, premier gène à répondre à cette élévation (Rahman *et al.*, 2004), induit l'expression de gènes normalement exprimés spécifiquement dans les gonades. Cette réponse ne conduit cependant pas directement à la tumorigenèse : elle doit être combinée à d'autres facteurs tels que la susceptibilité génétique, l'expression de SV40-T ou l'absence d'inhibine.

Chez l'homme, la surexpression de GATA-4, au niveau messager et protéique, est observée dans une petite proportion d'adénomes et de carcinomes (Kiiveri *et al.*, 2005), et a été reliée à un comportement agressif de la tumeur (Barbosa *et al.*, 2004). L'expression de GATA-6 est fréquemment diminuée dans les TCS et son niveau d'expression dans les adénomes est plus élevé que dans les carcinomes (Kiiveri *et al.*, 2005). Des études ont rapporté des néoplasmes subcapsulaires chez l'homme, avec des taux élevés de gonadotropes, impliquant ainsi la LH dans la tumorigenèse humaine (Bielinska *et al.*, 2006). Il semble donc exister un lien entre la surexpression de LHR et de GATA-4 dans la tumorigenèse corticosurrénalienn, en fonction du type de néoplasie.

Ces modèles, bien que très intéressants, restent cependant limités dans leurs applications car il existe de multiples voies qui conduisent à la formation et au maintien du phénotype tumoral, et cette voie, GATA-4/LHR, ne représente qu'une très petite fraction des TCS humaines.

### 5.3 Transplantation hétérologue de cellules : formation d'un néo-organe

Au laboratoire, nous utilisons un modèle *in vivo* de transplantation hétérologue de cellules corticosurréaliennes, développé par Thomas *et al.* (1997, 1999). Dans ce modèle (Figure 31), des cellules corticosurréaliennes bovines (BAC) ou humaines issues de cultures primaires *in vitro* sont implantées sous la capsule rénale de souris immunodéficientes Scid (Severe combined immuno-deficiency) surrénalectomisées. Les souris transplantées reçoivent un traitement substitutif corticoïde pendant une semaine, puis la greffe donne naissance à un néo-organe corticosurrénalien, vascularisé, différencié et fonctionnel : la sécrétion de corticoïdes par ce néo-organe permet aux animaux d'échapper à la mort par insuffisance surrénalienne (Thomas *et al.*, 1997).

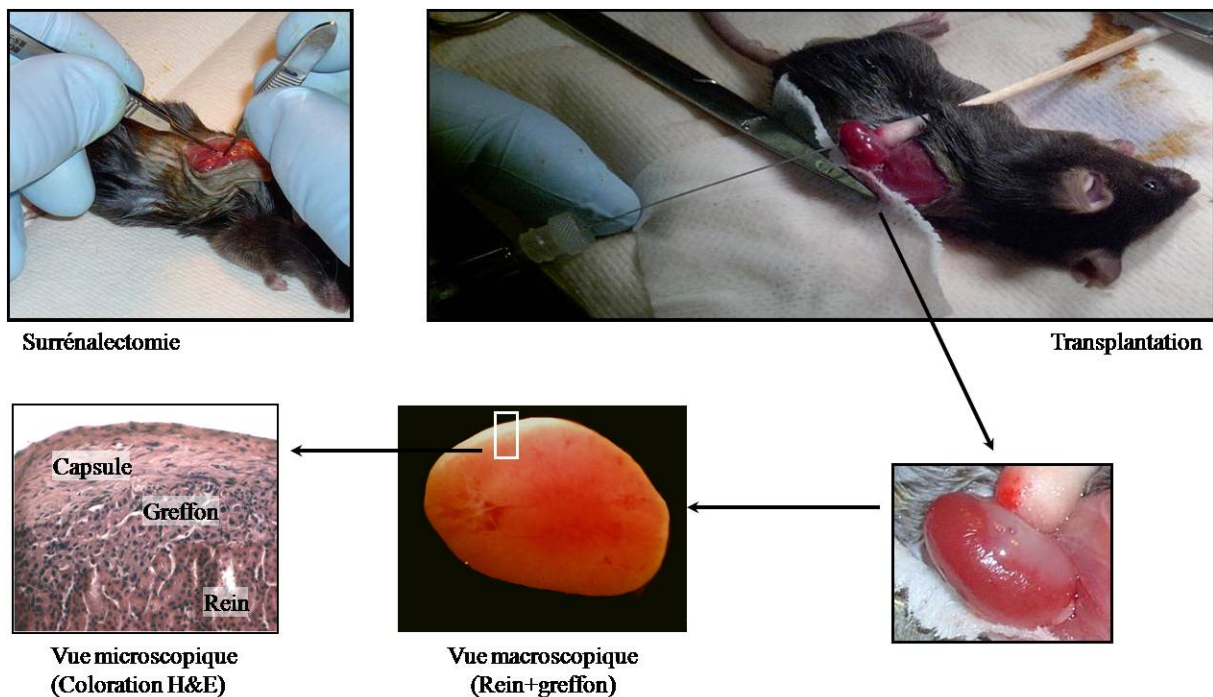


Figure 31 : Transplantation de cellules corticosurréaliennes sous la capsule rénale de souris immunodéficientes surrénalectomisées et formation d'un néo-organe fonctionnel.

Un des grands intérêts de ce modèle est l'observation phénotypique et physiologique du néo-organe, tout particulièrement dans le cadre de la tumorigenèse. En effet, la manipulation génétique des cellules avant transplantation rend possible la formation d'un nouveau cortex surrénal qui peut être considéré comme un tissu transgénique. Ainsi, Thomas *et al.* (2002) ont démontré que l'infection des cellules corticosurrénaliennes bovines par trois gènes, *hTERT* (sous-unité catalytique de la télomérase humaine), SV40-T et *H-Ras*<sup>G12V</sup> (version oncogénique du proto-oncogène Ras), suivie de leur transplantation chez la souris immunodéficiente, conduit au développement de TCS malignes (Thomas *et al.*, 2002).

Parmi les cellules corticosurrénaliennes de mammifères, le choix de l'espèce bovine pour l'étude *in vivo* présente de nombreux avantages tels que la disponibilité des données dans la littérature, la similarité entre le bovin et l'humain de la fonction corticosurrénaliennne, et de l'horloge mitotique (raccourcissement de la longueur des télomères), ainsi que l'accès plus facile aux tissus bovins face à la difficulté d'obtention des surrénales humaines. Le modèle cellulaire utilisé au laboratoire est représenté par les cellules de la zone fasciculo-réticulée du cortex surrénal bovin (Duperray and Chambaz, 1980), dont les produits majeurs de sécrétion sont le cortisol et la corticostérone (Dobson and Kanchev, 1977). Le schéma de la stéroïdogénèse chez l'homme, présenté dans la Figure 4, s'applique aussi aux bovins qui produisent également du cortisol comme principal glucocorticoïde. La seule différence entre ces deux espèces concerne les enzymes codées par les gènes *CYP11B* (Tableau 1) : chez l'homme, deux gènes distincts codent pour la 11 $\beta$ -hydroxylase (gène *CYP11B1*) et pour l'aldostérone synthase (gène *CYP11B2*) ; chez le bovin, un seul gène, *CYP11B*, code pour une protéine qui, selon le contexte cellulaire, fasciculée ou glomérulée, présente une activité 11 $\beta$ -hydroxylase ou aldostérone synthase, respectivement. De plus, les mêmes différences histologiques entre les cellules des trois zones du cortex sont observées chez le bovin ; les cellules de la fasciculé sont toutefois plus pauvres en lipides (Fruhling *et al.*, 1970 ; Nussdorfer, 1986). Dans les cellules corticosurrénaliennes murines, la 17 $\alpha$ -hydroxylase est absente ; le produit final de la synthèse est la corticostérone et non le cortisol. Ainsi, dans ce modèle de transplantation, le principal glucocorticoïde sécrété par les souris, la corticostérone, est remplacé par le cortisol d'origine bovine synthétisé par le néo-organe.





## **OBJECTIFS DE L'ÉTUDE**

---



Les connaissances sur le développement tumoral corticosurrénalien progressent lentement notamment parce que les tumeurs malignes du cortex surrénal sont rares, contrairement aux tumeurs du côlon, le type le mieux étudié dans le domaine de la progression tumorale (Kinzler and Vogelstein, 1996). A l'heure actuelle, les anomalies des tumeurs corticosurréaliennes, bénignes et malignes, sont relativement bien caractérisées. Il apparaît ainsi que les altérations les plus fréquemment liées aux carcinomes sont, par ordre de fréquence, la mutation de *N-Ras* (12,5%) (Yashiro *et al.*, 1994), la mutation de *TP53* (25 à 33%) (Sidhu *et al.*, 2005 ; Libé *et al.*, 2007a) et la surexpression de *IGF-2* (90%) (Ilvesmaki *et al.*, 1993b ; Gicquel *et al.*, 1997 ; Boulle *et al.*, 2001). Il n'est cependant pas connu si plusieurs de ces altérations sont présentent simultanément dans les CCS et leur implication dans chaque étape du processus tumoral, de l'initiation à la formation de tumeurs métastatiques, reste à être clairement établie. La surexpression de *IGF-2* et la mutation de *TP53* étant essentiellement retrouvées dans les carcinomes (Ohgaki *et al.*, 1993 ; Gicquel *et al.*, 1997 ; Barzon *et al.*, 2001a ; Boulle *et al.*, 2001), il semble que ces anomalies soient plus impliquées dans la progression tumorale que dans l'initiation. A l'inverse, la mutation de *Ras*, retrouvée avec la même fréquence dans les ACS et CCS (Yashiro *et al.*, 1994), est très certainement un événement précoce. Récemment, Tissier *et al.* (2005) ont mis en évidence que  $\beta$ -caténine, très impliquée dans la tumorigenèse humaine, est également mutée avec la même fréquence dans les ACS et CCS, à hauteur de 30%. Il semblerait donc que la mutation de  *$\beta$ -caténine* soit la mutation la plus fréquente dans les TCS et que, tout comme celle de *Ras*, il s'agisse d'un événement précoce voire initiateur du processus de tumorigenèse corticosurrénalienne.

Dans l'optique de confirmer ces hypothèses et de mieux comprendre l'implication de chacune de ces quatre altérations dans l'oncogenèse corticosurrénalienne, nous avons choisi de mimer ces altérations génétiques en surexprimant, dans des BAC primaires, une forme oncogénique de *Ras*, *Ras*<sup>G12V</sup>, un mutant constitutivement actif de  *$\beta$ -caténine*,  *$\beta$ -caténine*<sup>S37A</sup>, un dominant négatif de *p53*, *p53*<sup>DD</sup>, et la forme sauvage de *IGF-2*. En utilisant ces quatre gènes dans le modèle de reconstruction tissulaire développé par Thomas *et al.* (1997), nous avons entrepris, dans un premier temps, de définir une combinaison minimale d'altérations génétiques permettant de complètement transformer les BAC primaires en cellules tumorales. Dans un second temps, nous avons déterminé le phénotype induit par chaque altération individuellement et finalement, nous avons étudié l'importance de l'ordre d'acquisition des altérations dans la mise en place du phénotype tumoral.



## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

---



## 1. PRÉSENTATION

Quatre altérations génétiques, présentent dans les adénomes et/ou les carcinomes nous ont particulièrement intéressées pour cette étude : la surexpression de *IGF-2* et les mutations de *Ras*, *TP53* et *β-caténine*. Dans l'optique de mimer ces altérations dans des cellules corticosurréaliennes normales et d'observer le phénotype induit par une ou plusieurs de ces altérations, nous avons génétiquement modifié des BAC primaires afin de leur faire surexprimer l'oncogène *Ras*<sup>G12V</sup>, le mutant *β-caténine*<sup>S37A</sup>, le dominant négatif *p53*<sup>DD</sup> et la forme sauvage de *IGF-2*.

Les cellules corticosurréaliennes bovines primaires ont été préparées à partir de glandes surrénales de jeunes adultes de deux ans, prélevées à l'abattoir, selon un protocole pratiqué depuis près de 30 ans au laboratoire (Duperray and Chambaz, 1980). Il s'agit de cultures primaires de la zone fasciculo-réticulée du cortex surrénal bovin, dont le produit majeur de sécrétion est le cortisol (Dobson and Kanchev, 1977).

La modification génétique des BAC primaires a été réalisée par transduction rétrovirale qui permet une très bonne stabilité et expression à long terme des gènes d'intérêt après sélection antibiotique : les vecteurs rétroviraux, porteurs des gènes d'intérêt, ont tout d'abord été transfectés stablement dans des cellules PT67, cellules d'encapsulation qui permettent de répliquer les gènes d'intérêt et de produire des particules rétrovirales défectives dans leur surnageant de culture (Figure 32). Les gènes d'intérêt ont finalement été transduits dans les BAC primaires par infection par les particules rétrovirales produites par les cellules PT67 (Figure 32).

La première étape de ce travail a consisté à sous-cloner *β-caténine*<sup>S37A</sup> dans le vecteur rétroviral pLPCX, les trois autres gènes étant déjà insérés dans des vecteurs rétroviraux : pLNCX2-IGF-2, pBabe-Hygro-Ras<sup>G12V</sup> et pBabe-Hygro-p53<sup>DD</sup> : l'ADNc de IGF2 nous a été fourni par le Pr. Y. Le Bouc (Le Bouc *et al.*, 1987), cloné dans pcDNA3 et le clonage de IGF-2 dans pLNCX2 a été réalisé avant mon arrivée au laboratoire ; le vecteur pBabe-Hygro-Ras<sup>G12V</sup> est un don du Pr. J. W. Shay (Morales *et al.*, 1999) ; le vecteur pBabe-Hygro-p53<sup>DD</sup> est un don du Pr. R. A. Weinberg<sup>11</sup> (Hahn *et al.*, 2002). L'ADNc de *β-caténine*<sup>S37A</sup> nous a été donné par le Pr. S. Byers (Orford *et al.*, 1997), cloné dans pcDNA3. Nous avons extrait de ce plasmide un fragment de 2 405 pb grâce à une étape de PCR, étape qui nous a en outre permis

<sup>11</sup><http://www.addgene.org/>



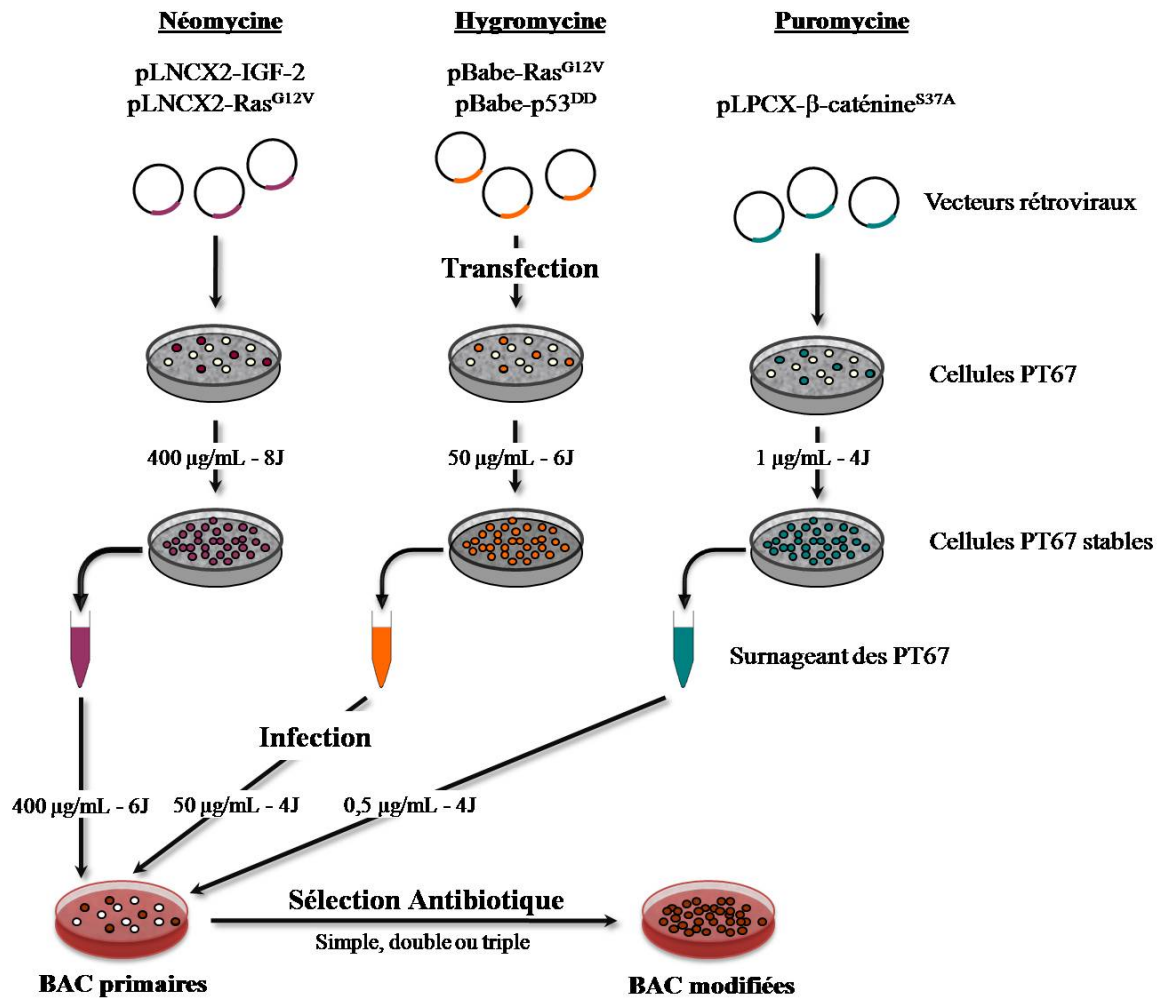
de créer des sites de restriction permettant la ligation finale de ce fragment dans pLPCX (Figure 33).

Nous voulions transduire un ou plusieurs gènes d'intérêt dans les BAC afin d'observer le phénotype induit par une ou plusieurs altérations génétiques. La transduction de plusieurs gènes d'intérêts nécessitait une sélection antibiotique multiple, chaque antibiotique correspondant au vecteur source de chaque gène, afin de s'assurer que la population finale surexprime bien tous les gènes transduits.  $Ras^{G12V}$  et  $p53^{DD}$  étant clonés au départ dans le même vecteur, la combinaison  $Ras^{G12V}/p53^{DD}$  nécessitait donc de sous-cloner un de ces gènes dans un autre vecteur.  $Ras^{G12V}$  a ainsi été sous-cloné dans pLNCX2, à partir de pBabe-Hygro- $Ras^{G12V}$  (Figure 34).

Finalement, nous disposions de quatre gènes d'intérêt clonés dans trois vecteurs rétroviraux différents, porteurs de gènes de résistance à un antibiotique différent (puromycine pour pLPCX, hygromycine pour pBabe-Hygro et néomycine pour pLNCX2), ce qui nous a permis de tester plusieurs combinaisons d'altérations génétiques dans l'espoir d'en obtenir une qui induise la formation d'une tumeur maligne chez l'animal transplanté. Nous avons ainsi testé les combinaisons suivantes : IGF-2/ $Ras^{G12V}$ ,  $\beta$ -caténine $^{S37A}/p53^{DD}$  et  $Ras^{G12V}/p53^{DD}$ . Chacun des quatre gènes a également été transduit individuellement dans les cellules afin d'observer le phénotype induit par une seule altération.

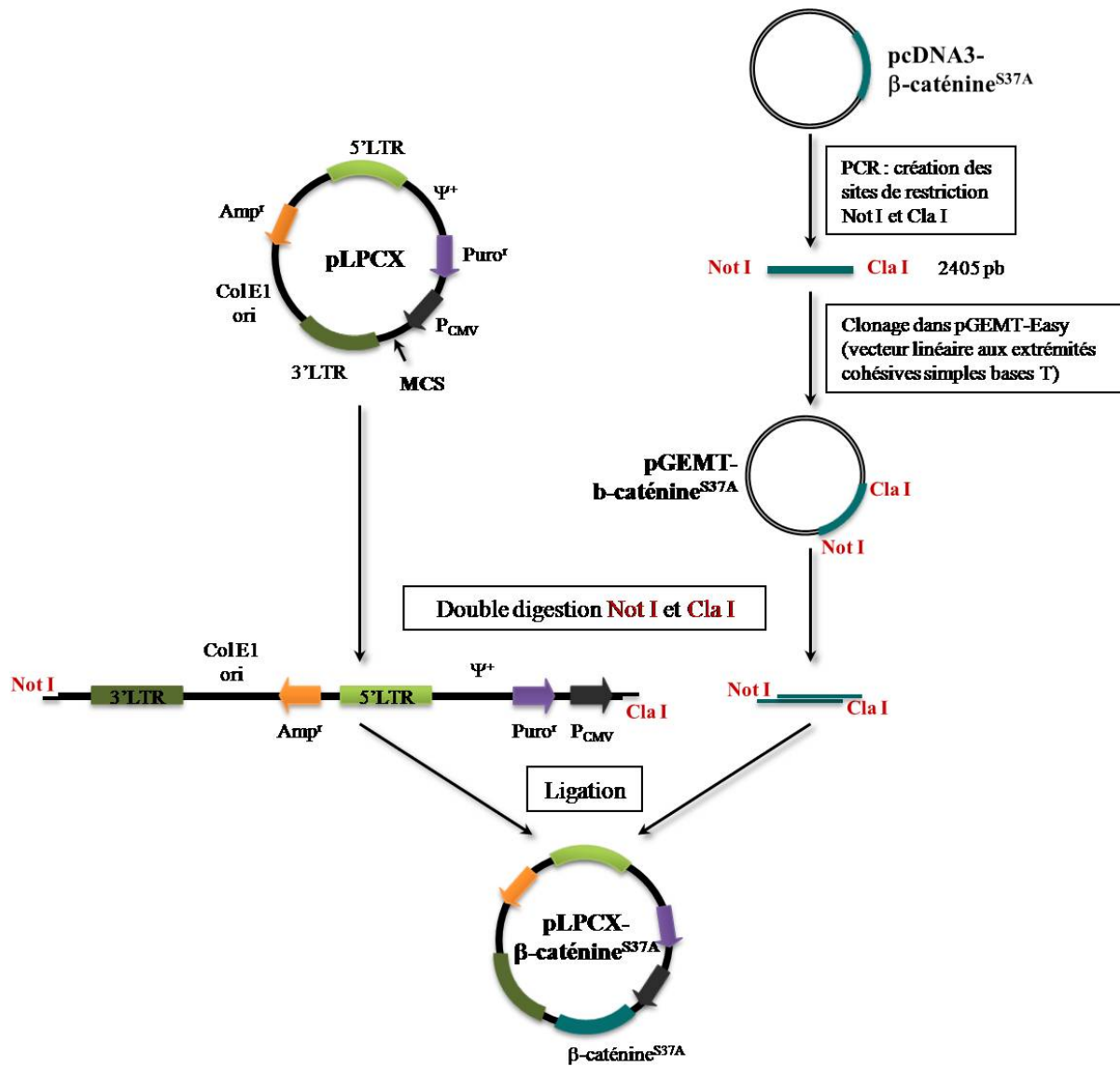
Après transplantation sous la capsule rénale de souris immunodéficientes, l'ensemble des combinaisons comportant les gènes codant pour IGF-2 et  $\beta$ -caténine $^{S37A}$ , a conduit à la formation d'une tumeur murine. Ces tumeurs détruisaient complètement le rein hôte et le greffon, et ne permettaient donc pas d'observer le phénotype corticosurrénalien induit par ces deux gènes. Nous nous sommes par la suite focalisés sur la combinaison  $Ras^{G12V}/p53^{DD}$  qui, en parallèle, nous donnait des résultats très encourageants.

L'exposé des résultats va donc être divisé en deux parties, la première présentant les résultats obtenus avec  $p53^{DD}$  et  $Ras^{G12V}$  qui ont donné lieu à un Article soumis à publication, et la seconde présentant les résultats obtenus avec IGF-2 et  $\beta$ -caténine $^{S37A}$ . Ces résultats, bien que très peu développés sont exposés car d'une part, ils ont représenté une grande partie de ces trois années de thèse et, d'autre part, ils apportent quelques renseignements intéressants pour la pathogénicité des tumeurs corticosurrénales.

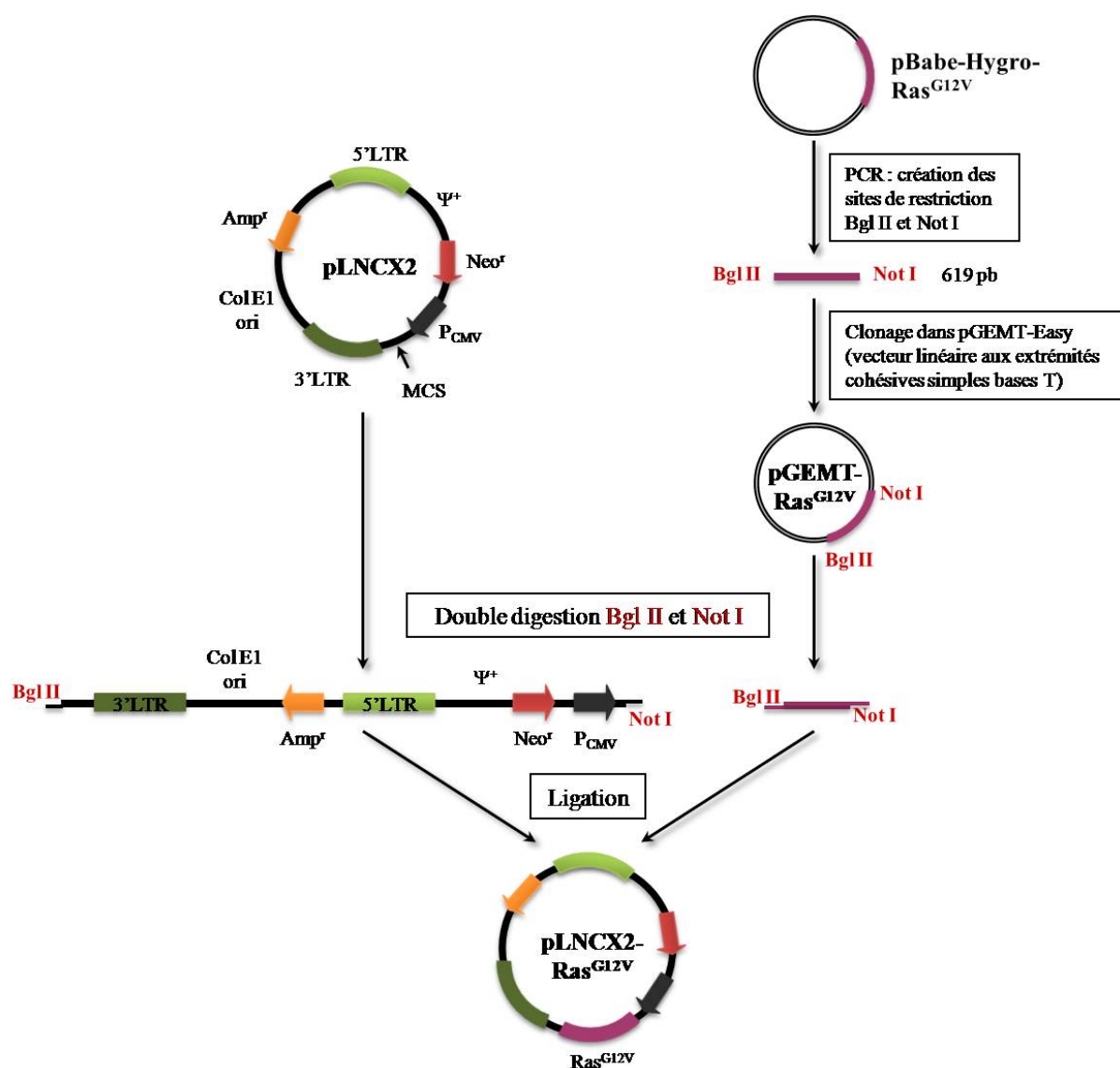


**Figure 32 :** Représentation schématique de la production de BAC génétiquement modifiés.

Dans un premier temps, les cellules d'encapsulation PT67 ont été transfectées individuellement avec un type de plasmide rétroviral ; cinq lignées stables de PT67, correspondant aux cinq vecteurs rétroviraux, ont donc été générées. Le surnageant de culture de ces cellules a ensuite été utilisé pour infecter les BAC primaires. Une infection simple a permis, après sélection avec l'antibiotique adéquat, d'obtenir une population polyclonale de BAC surexprimant stablement un seul gène d'intérêt, IGF-2, Ras<sup>G12V</sup>, p53<sup>DD</sup> ou βcaténine<sup>S37A</sup>. Pour obtenir des BAC surexprimant deux gènes d'intérêt, des doubles infections simultanées ont été effectuées, en mélangeant des volumes équivalents de surnageants de culture de deux types de PT67 et en prenant soin d'utiliser deux vecteurs porteurs de gènes de résistance à un antibiotique différent, afin d'effectuer une double sélection antibiotique.



**Figure 33 :** Représentation schématique de l'approche moléculaire utilisée pour construire le vecteur rétroviral pLPCX-β-caténine<sup>S37A</sup>.



**Figure 34 :** Représentation schématique de l'approche moléculaire utilisée pour construire le vecteur rétroviral pLNCX2-Ras<sup>G12V</sup>.



## 2. SUREXPRESSION DE RAS<sup>G12V</sup> ET/OU p53<sup>DD</sup>

---

Nous avons employé un modèle de reconstruction tissulaire *in vivo* pour identifier des événements moléculaires coopérant dans la formation d'une tumeur maligne corticosurrénalienne et ainsi mieux appréhender le processus tumoral global. Nous nous sommes focalisés sur le phénotype induit par deux altérations retrouvées fréquemment dans les TCS sporadiques : l'activation constitutive des voies de signalisation impliquant Ras (Yashiro *et al.*, 1994), via l'expression de l'oncogène Ras<sup>G12V</sup>, et l'inactivation de la voie p53 (Ohgaki *et al.*, 1993 ; Reincke *et al.*, 1994 ; Barzon *et al.*, 2001a ; Sidhu *et al.*, 2005 ; Libé *et al.*, 2007b), via l'expression du dominant négatif p53<sup>DD</sup> (Hahn *et al.*, 2002).

### 2.1 Article soumis : “The Order of Acquisition of Adrenocortical Tumor-Associated Mutations Leads to Distinct Tumor Phenotypes”

Les résultats de ce travail sont exposés dans l'Article suivant, soumis à publication.



## **The Order of Acquisition of Adrenocortical Tumor-Associated Mutations Leads to Distinct Tumor Phenotypes**

Maryline Herbert<sup>1,2</sup>, Jean-Jacques Feige<sup>1,2</sup> and Michaël Thomas<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 878, Grenoble, France

<sup>2</sup> Commissariat à l'Énergie Atomique, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Grenoble, France

**\*Correspondence:**

[michael.thomas@cea.fr](mailto:michael.thomas@cea.fr); tel.: +33 1 438 78 44 64; fax: +33 1 438 78 50 58.

**Running title:** Mutational events affect tumor phenotype



## **Summary**

We have developed a mouse model for adrenocortical tumor progression by using primary bovine adrenocortical cells, a retroviral gene delivery technique and a tissue reconstruction model. The introduction in different orders of the oncogenic allele of H-Ras (H-Ras<sup>G12V</sup>) and the disruption of the p53 pathway by the expression of p53<sup>DD</sup> yielded cell populations that formed tumors displaying major differences in histopathology, tumorigenicity and metastatic behavior. Whereas the successive expression of p53<sup>DD</sup> and Ras<sup>G12V</sup> yielded to benign tumors, the reverse sequence gave rise to highly malignant tumors with metastatic behavior, reminiscent of those formed after the simultaneous introduction of p53<sup>DD</sup> and Ras<sup>G12V</sup>. Thus, the tumor phenotype expressed by adrenocortical cells is strongly influenced by the order of genetic alterations acquisition.

## **Significance**

Sporadic adrenocortical carcinoma is a rare endocrine neoplasm with a dismal prognosis. By contrast, benign tumors are common in the general population. Whether benign tumors represent a separate entity or are in fact part of a process of tumor progression leading ultimately to an adrenal carcinoma is still an unresolved issue. We developed a tissue reconstruction model in mice that allows direct comparison of cells modified with sequential introduction of two genetic events. This revealed that adrenocortical tumor development follows a multistage progression and that the tumor phenotype, including histopathology and metastatic behavior is directly influenced by the order of acquisition of genetic alterations.

## Introduction

Cancer is an extremely heterogeneous disease. Thus, tumors in different organs display markedly different clinical behaviors and tumors that arise in a single tissue can even exhibit an array of pathologies, ranging from benign adenomas to highly invasive malignancies (Bardeesy and DePinho, 2002; Troyer et al., 2004). The phenotypic diversity observed in these tumors has been generally ascribed to the deregulation of multiple signal transduction pathways. However, it remains unclear for most cancers which genetic alterations in an individual cell or group of cells play a causative role in tumor initiation and progression, and which ones represent bystanders with no selective advantage. Cellular transformation is a process where a normal cell accumulates mutations, as well as epigenetic changes, that activate oncogenes or down-regulate tumor suppressor genes to give rise to a clonal expansion of a subset of transformed cells, independently of both external and internal signals that normally control cell growth (Hanahan and Weinberg, 2000; Paulovich et al., 1997). This general concept of multistage tumorigenesis has been demonstrated in the case of the colon cancer where distinct histological stages are directly correlated with genetic alterations in key tumor suppressors and oncogenes. Most adenomatous polyps of the colon, even though they are the precursors of invasive cancer, never actually progress to that stage (Fearon and Vogelstein, 1990; Vogelstein and Kinzler, 1993). Thus, clinically the occurrence of benign tumors is much more frequent than carcinomas.

Sporadic adrenal carcinomas (ACCs) are rare endocrine neoplasms in humans, notorious for its aggressive behavior, metastatic potential and poor outcome (Allolio and Fassnacht, 2006; Kirschner, 2006). By contrast, benign adrenocortical adenomas (ACAs) are common in the general population and are generally found incidentally (Grumbach et al., 2003). Whether adenoma represents a separate entity or is in fact part of a process of tumor progression leading to the emergence of an ACC is still an open question. The prevalence rate of cortical adenomas in a series of surgically resected incidental tumors is of 53% (Angeli et al., 1997) whereas the incidence for ACC is between 4 to 12 new cases per million in adults (Grumbach et al., 2003). From those numbers, it is clear that the frequency of adenomas is much higher than the frequency of ACC, which is consistent with the hypothesis that only a very small fraction of adenomas will progress to cancer in patients. Although, the direct progression of benign adrenocortical tumors to malignant carcinoma has not been clearly demonstrated, the best evidence for a multistage adrenal tumorigenesis comes from a clinical case where a localized tumor was found to be composed of a benign part surrounding by a

malignant area (Bernard et al., 2003). Progress into the elucidation of the genes and pathways involved in the pathogenesis of sporadic ACC has been slower than that for most other cancers, largely because of the rarity of this tumor (Libé and Bertherat, 2005; Soon et al., 2008) and also because of the lack of a suitable animal model for unraveling the role of a given genetic alteration and its possible cooperation with other gene defect in the pathogenesis of the disease..

We had previously determined that the sequential introduction of the catalytic subunit of the human telomerase (hTERT), the simian virus 40 (SV40) large T (LT) and an oncogenic allele of Ras (Ras<sup>G12V</sup>) sufficed to transform bovine adrenocortical cells to tumorigenic cells when transplanted beneath the kidney capsule of Severe combined immunodeficiency (Scid) mice (Thomas et al., 2002a). Our data suggest that a limited number of genetic alterations cooperate to transform long-lived mammal adrenocortical cells. Subsequently, it has been shown that hTERT is not an absolute requirement for fully transform normal human and bovine adrenocortical cells in the same experimental model (Sun et al., 2004). However, since such studies were using LT viral oncoprotein of SV40, the specific pathways needed to be disrupted to induce tumorigenesis remained undefined. Thus, LT has been shown to bind and inactivate a series of host cellular proteins including p53 (Manfredi and Prives, 1994), retinoblastoma family proteins, such as pRB, p107 and p130 (Moran, 1993), DNA-polymerase  $\alpha$  (Smale and Tjian, 1986), transcriptional co-activator p300 (Avantaggiati et al., 1996; Lill et al., 1997) and cyclin A and p33<sup>cdk2</sup> (Adamczewski et al., 1993). Most of these molecules play important roles in controlling entry into and progression through the cell cycle and the interaction of LT with these cellular proteins is crucial for tumorigenesis. Recently, the perturbation of the tumor suppressors pRB and p53 has been shown to replace the functions of SV40 LT in the combination of genes to transform normal human cells (Boehm et al., 2005; Kendall et al., 2005).

We sought to develop an *in vivo* system for the transformation of primary adrenocortical cells into a tumorigenic state to characterize the functional impact of minimal genetic alterations associated with human adrenocortical tumors and by doing so, to be able to begin to define the changes generate by each genetic alterations. Proto-oncogene *N-Ras* has been found mutated in 12.5% of adrenocortical tumors, with an equal prevalence in ACA and ACC (Yashiro et al., 1994). Besides perturbation of the Ras pathway, it is noteworthy that overexpression of the epithelial growth factor receptor (EGFR) is a common genetic alteration in adrenocortical tumor with a frequency of 43% in ACAs and almost 100% in ACCs (Kamio et al., 1990; Sasano et al., 1994), and is frequently associated with an overexpression of TGF-

$\alpha$ , a natural ligand of EGFR in ACCs (Sasano et al., 1994). Moreover, as the signal transducing tyrosine kinase activity of the EGFR is mediated by Ras proteins among others, it is conceivable that chronically active wild type Ras promotes tumorigenesis through activation of multiple Ras effectors that contribute to deregulated cell growth, dedifferentiation, and increased survival, migration and invasion. Somatic mutations in the *TP53* tumor suppressor gene occur in 25% to 33% of ACCs but not in benign tumors (Barzon et al., 2001; Libé et al., 2007; Ohgaki et al., 1993; Reincke et al., 1994; Sidhu et al., 2005), suggesting that mutation in *TP53* is rather involved in tumor progression than initiation.

Since the number of genetic alterations needed for transformation may be influenced by experimental systems choose, we compared the subcutaneously injection usually utilized when mammalian cells are assayed for their tumorigenicity and the subrenal capsule (SRC) assay. If the cell survival is low, as it is in conventional assays, an undesired selection advantage might take place among the cells that would lead them to acquire a molecular phenotype different from the one of the general cell population. In contrast, the SRC assay is an advantageous site for the survival and growth of cancer cells due to the rapid angiogenic response of the densely developed renal vasculature for the delivery of oxygen and nutrients. Thus, our studies on adrenocortical cells showed that injection of normal primary adrenocortical cells under the kidney capsule was an important feature for the reconstruction of a functional vascularized tissue whereas they did not survive when placed subcutaneously (Hornsby et al., 1998; Thomas et al., 1997).

Here we report the development of a mouse model for adrenocortical tumorigenesis with defined genetic lesions. We used a murine retroviral gene delivery system to introduce multiple genetic lesions in primary bovine adrenocortical cells (BAC). Cells transduced with either a dominant-negative p53 (p53<sup>DD</sup>) or an oncogenic allele of Ras (Ras<sup>G12V</sup>) alone or, the combination of both in various order, produced unique phenotypic changes that we were able to characterize in our tissue reconstruction model. This mouse model represents a useful tool for deciphering the molecular basis of adrenocortical pathogenesis.

## Results and discussion

### Expression of Ras<sup>G12V</sup> and p53<sup>DD</sup> in bovine adrenocortical cells alters their growth properties in culture

To explore the dynamic process of adrenocortical tumorigenesis, we sought to identify the dysregulated pathways required to initiate and then promote tumor growth. Both expression of H-Ras<sup>G12V</sup> and SV40 large T antigen had been previously shown to be sufficient to convert primary bovine adrenocortical cells into fully malignant tumor cells (Sun et al., 2004). The requirement of LT for transformation renders the analysis of those results complicated. Indeed, LT viral oncoprotein is known to have several functions and target a wide range of cellular proteins (Adamczewski et al., 1993; Avantaggiati et al., 1996; Lill et al., 1997; Manfredi and Prives, 1994; Moran, 1993; Smale and Tjian, 1986). Moreover, the SV40 proteins are rarely involved in the etiology of human cancers (Gazdar et al., 2002). Recently, ablation of both mammalian pRB and p53 tumor suppressor pathways has been shown to be sufficient to replace the function of LT oncoprotein and then, to transform human fibroblasts in presence of hTERT, small t antigen of SV40 and H-Ras<sup>G12V</sup> into a tumorigenic state (Boehm et al., 2005).

To identify the minimal combination of genetic alterations required to fully transform normal adrenocortical cells, we decided to perturb two signaling pathways in a fashion akin to that found in human cancers (Hanahan and Weinberg, 2000), by stably infecting a mixed population of primary adrenocortical cells (pBACs) prepared by enzymatic digestion of adrenal glands from 2-yr-old steers (Duperray and Chambaz, 1980). The Ras signaling pathway was perturbed by an oncogenic allele of *H-Ras*: mutation at codon 12 in *H-Ras* impairs its intrinsic GTPase activity and confers insensitivity to cytosolic GTPase-activating proteins, thereby blocking Ras into an active conformation for signaling through a variety of effector pathways (Shields et al., 2000). p53 function was disrupted by p53<sup>DD</sup>, a dominant-negative form of wild-type p53 (Shaulian et al., 1992). The pBACs were infected simultaneously with replication-defective amphotropic retroviruses based on Moloney Murine Leukemia Virus expressing p53<sup>DD</sup> (Hahn et al., 2002) and *H-Ras*<sup>G12V</sup> (Hahn et al., 1999), each encoding a drug selection marker, hygromycin and neomycin, respectively. Following infection, the population of cells was containing a mixture of singly and doubly transduced and nontransduced cells. The cells were then selected for 8 days by supplementing the culture medium with neomycin and hygromycin. At the end of the selection process, we established a polyclonal population termed p53<sup>DD</sup>/Ras<sup>G12V</sup> (PR) cells (**Figure 1A**). For each infection, a

parallel culture of cells was infected simultaneously either with a retrovirus expressing  $p53^{DD}$  (P) and a control pLNCX2 (pL) retrovirus expressing only the selection marker neomycin, or with a retrovirus expressing  $Ras^{G12V}$  (R) and a control pBabe-Hygro (pB) retrovirus expressing only the selection marker hygromycin. Thus, we established two control populations termed P and R, respectively (**Figure 1A**). The resultant three polyclonal cell populations were confirmed to express the desired transgenes by RT-PCR (**Figure 1B**). For  $p53^{DD}$  expression, we used one primer unique to the express region of the retroviral vector and another anchored in the desired transgene to specifically amplify only the ectopically expressed version of this mammalian transcript. Concerning  $Ras^{G12V}$ , both primers were anchored in the transgene, however, no endogenous expression were detected in control cells infected with pLNCX2 (control selected stable infected cells transduced with an empty vector encoding only the drug resistance gene) (**Figure 1B**).

To monitor the cellular responses to oncogenic lesions in BACs in culture, we compared the microscopic appearance of these three cell populations *in vitro*. R and P cells presented similar morphology in cell culture than pLNCX2 cells (**Figure 1C**). In sharp contrast, the polyclonal cell population expressing both  $p53^{DD}$  and  $Ras^{G12V}$  had a very different morphology. These PR cells were very small as compared to R or P cells, and did not resemble to adrenocortical cells anymore (**Figure 1C**). In order to assess the effect of the alteration of p53 and Ras pathways signaling on cell proliferation, we characterized the growth properties of P, R and PR cells by assessing relative cell accumulation for 7 days post-plating. The replication of R and P cells ceased at high density suggesting that these cells were still sensitive to contact inhibition (**Figure 1D**), a regulatory mechanism through which cells enter a stage of reversible G1 arrest (Fagotto and Gumbiner, 1996). In contrast, PR cells did not demonstrate any decrease in cell proliferation at high cell density and form multilayered foci in culture (**Figures 1C and 1D**), a phenomenon commonly associated with malignant transformation (Abercrombie, 1979; Fagotto and Gumbiner, 1996). Thus, infection of adrenocortical cells with the combination of  $p53^{DD}$  and  $Ras^{G12V}$  increased dramatically the proliferation rate in comparison to the adrenocortical cells infected with either  $p53^{DD}$  or  $Ras^{G12V}$  (**Figure 1D**). We also studied the proliferation by determining the percentage of Ki-67 positive cells in each cell population. Ki-67 is a nonhistone nuclear protein expressed in all cell cycle phases, except G0/early G1. In fully supplemented medium, each of these populations displayed a similar percentage of cells engaged in the cell cycle (**Figure 1E**). However, when the cells were maintained in culture medium in absence of mitogens, only cells transduced with  $Ras^{G12V}$  and  $p53^{DD}$  displayed a complete independence from extrinsic

mitogens for proliferation. Cells expressing p53<sup>DD</sup> as well as pLNCX2 cells required mitogens for their proliferation, whereas R cells exhibited a reduced dependence to growth factors (**Figure 1E**). Therefore, in cells with defective p53 signaling, oncogenic Ras is able to substitute for a mitogenic signal to the cell cycle. Finally, to assess the effect of the combined expression of p53<sup>DD</sup> and Ras<sup>G12V</sup> genes on the oncogenic process, the PR cell population and the two control cell populations P and R, were suspended in soft agar to assay for anchorage-independent growth, a common characteristic of cancer cells. Whereas expression of p53<sup>DD</sup> was unable to support anchorage-independent growth of adrenocortical cells, cells expressing Ras<sup>G12V</sup> formed small abortive colonies characteristic of transit-amplifying cells (**Table 1**). The expression of both p53<sup>DD</sup> and Ras<sup>G12V</sup> led to robust transformed cell growth in soft agar (**Table 1**).

We then concluded from these experiments that PR cells were tumorigenic since they expressed in their phenotype all the *in vitro* characteristics ascribed to transformed cells, *i.e.* to proliferate in absence of extrinsic mitogens and in absence of anchorage, and to form colonies within monolayers of contact-inhibited cells.

### **Rapid tumor induction by adrenocortical cells expressing Ras<sup>G12V</sup> and p53<sup>DD</sup>**

Mutation or overexpression of genes such as *TP53* and *Ras* are detected in human adrenocortical tumors (Koch et al., 2002), however, it is not known whether these genetic changes must occur in combination to induce tumor growth. Then, we next addressed whether these two genetic changes are sufficient to endow the bovine adrenocortical cells with the ability to induce adrenal carcinoma once transplanted into immunocompromised mice. Our previous studies on adrenocortical cells showed that transrenal injection of cells beneath the kidney capsule was ideal for cell survival by providing a suitable microenvironment, permitting functional vascularized tissue formation from normal primary and genetically modified cells (Mazzuco et al., 2006a; Mazzuco et al., 2006b; Thomas et al., 1997; Thomas et al., 2002a; Thomas et al., 2002b; Thomas et al., 2000). Although the subrenal capsule is an ectopic site for adrenocortical cells, tissues formed recapitulate histological features characteristic of normal or pathological adrenal cortex. Tissue reconstruction models differ from conventional assays in immunodeficient mice (subcutaneous or intra-muscular injection of cell suspension) in that the cell survival is not severely compromised by the implantation technique. If the cell survival is low, as it is in conventional assays, an undesired selection advantage might take place among the cells that would lead them to acquire a molecular phenotype different from the one of the general cell population.



The PR cells were transplanted beneath the kidney capsule of adrenalectomized Scid mice, and the efficiency of tumor formation, and the latency with which they formed, was regularly examined by sacrificed the mice at day 8, 14 and 21. The rate of tumor formation was 100% of the mice transplanted with PR cells. No latency period was observable suggesting that the microenvironment provided by the subrenal capsule was strongly favorable to the tumor development. The transplanted PR cells produced continuously expanded tumor masses, which first protruded from the site of transplantation and finally destroyed the kidney (**Figures 2A** and **Figure 3B**). Eight days following cell transplantation, the histological examination showed that the xenografts were forming solid tissue structure on the kidney surface with no sign of dying areas (**Figure 2**). At these early days, an air bubble might be occasionally seen in the growing tissue and witnessed the full injection of the cells beneath the kidney capsule at the time of transplantation (**Figure 2B**). Invasive characteristic of the tumors was evidenced by day 14 after transplantation, as they infiltrated the adjacent kidney parenchyma (**Figures 2B** and **2C**) and by day 21, neighboring tissues, the skeletal muscle and the fat (**Figures 2D** and **2E**). Ultimately, by day 35, the tumor totally destroyed the kidney (**Figures 3A** and **3B**) and after Hematoxyline & Eosine staining, invasion of fat, muscle and pancreas was observed in all of the tumor bearing mice (**Figures 3H** to **3J**). The tumors were poorly differentiated carcinomas composed of eosinophilic cells with high nuclear grade, high mitotic activity and prominent nucleoli (**Figures 2B** and **3C**). Necrosis areas were commonly found in tumors at day 35 (**Figure 3C**), a typical histopathological marker of malignancy and rare apoptotic cells were detected by Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL) assay (**Figure 3G**). Examination of Ki-67 expression showed that the cells had a very high proliferation rate which was sustained over time (**Figures 2C** and **3F**). Immunoperoxidase staining with the Ras antibody 18 and the p53 antibody pAb421 showed strong staining throughout the tumor, confirming the long term expression of the transgenes (**Figures 2D** and **2E**; **Figures 3D** and **3E**).

Metastases arise following the spread of cancer cells from the primary site and the formation of new tumors in distant organs and are responsible for 90% of deaths from solid tumors (Gupta and Massague, 2006). The metastatic process comprises a series of steps including angiogenesis and lymphangiogenesis, which represent the way the tumor cells escape the confines of the primary tumor. Moreover, the formation of new blood vessels is an absolute requirement in the early development of the tumor by providing oxygen and nutrients to the cells. We consistently observed a dense vascular network on the surface of the PR

masses that was confirmed on tissue sections by immunofluorescence with an antibody against CD31 (**Figure 3K**). Within the first 3 weeks of adrenocortical cell transplantation, the tumor was confined to the kidney in mice that were sacrificed. At day 35 nevertheless, it was clear on gross appearance that the primary tumor had spread to intraperitoneal organs. Metastatic sites included the spleen, diaphragm, abdominal muscle and the mesentery (**Figure 3M**). Most of the metastases grew on the surface of the organs (**Figure 3M**) and the cells forming the metastases were issued from the PR primary tumors as demonstrated by Ras and p53 immunohistochemical staining (**Figure 3N** and **Data not shown**). Although it was thought that such metastases exclusively involve passage of malignant cells through pre-existing peritumoral lymphatic vessels by a passive process, recent experimental studies and clinicopathological reports suggest that lymphangiogenesis induced by solid tumor can promote tumor spread through the secretion of lymphangiogenic growth factors (Achen et al., 2006; Achen and Stacker, 2006). To understand how the PR cells metastasized, we investigated the presence of lymphatic vessels in primary tumors by an immunofluorescence staining for LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1), a specific marker of lymphatic endothelial cells (Prevo et al., 2001). At the time where metastases were detected, numerous lymphatics were present in the tumor (**Figure 3K**), suggesting that the spread of tumor cells might occur through the *de novo* development of a lymphatic network.

Functionally, the tumors produced cortisol that replaced cortisosterone normally secreted by the mouse adrenals and thus, rescued the animals from the lethal effect of adrenalectomy until they were sacrificed (**Data not shown**). In addition to the cortisol production, we wanted to ascertain that the tumors and metastases were formed from adrenocortical cells transformed by the transduction of p53<sup>DD</sup> and Ras<sup>G12V</sup> and not from primary adrenocortical culture-contaminating cells such as fibroblasts or other stromal cells, which would also have been transformed and transplanted. Expression of the steroidogenic phenotype of the tumors was demonstrated by immunohistochemical detection of the steroid-converting enzyme type II 3-beta-hydroxy-d5-steroid dehydrogenase/isomerase-1 (3 $\beta$ HSD) involved in cortisol biosynthesis (**Figure 3L**).

The formation of malignant tumors by cells expressing only Ras<sup>G12V</sup> and p53<sup>DD</sup> was unexpected, in view of the fact that it has been previously shown that adrenocortical cells require at least the combination of the ablation of two tumor suppressor genes (p53 and Rb through the expression of SV40 large T antigen) and the mutation in one oncogene (expression of Ras<sup>G12V</sup>) (Sun et al., 2004). To rule out the possibility that mutations other than the introduction of Ras<sup>G12V</sup> and p53<sup>DD</sup> occurred during the process of engineering the PR

cells, we ensured to keep our population polyclonal, to reduce the period *in vitro* for their generation to the shortest possible and to independently produce three others PR polyclonal population from pBACs. Following their transplantation, the tumors were formed in 100% of injected Scid mice and the tumors were highly neoplastic and poorly differentiated, invading the adjacent kidney and organs (**Data not shown**). According to the fact that it is unlikely that four polyclonal cell populations have acquired a same mutation that was essential for tumorigenesis, we can conclude that the malignant potential of the cell population is a property of transduced PR cells in general rather than the result of an overgrowth of a minority cell type. So, the simultaneous alteration of both p53 and Ras pathways is sufficient to fully transform primary adrenocortical cells and form metastatic adrenocortical carcinomas when transplanted into mice.

#### **Subcutaneous injection of bovine adrenocortical cells expressing Ras<sup>G12V</sup> and p53<sup>DD</sup> failed to form tumor**

The organ microenvironment can markedly change the gene-expression patterns of tumor cells, and therefore their behavior and growth ability. To examine that influence, we introduced the same number of PR cells ( $2 \times 10^6$ ) into the subcutaneous space of Scid mice, the conventional assay for assessment of tumorigenicity. None of the six animals injected with PR cell suspension developed expanded tumors. The small nodules observed after the injection never enlarged and remained stable in size up three months, time where the experiment was stopped (**Figure 4A** and **Data not shown**). The tumors were poorly differentiated with infiltrative cells that invaded the adjacent skeletal muscle and fat, without zones of necrosis (**Figures 4B**). The PR cells were less tumorigenic when transplanted into the subcutaneous space and completely lacked metastatic ability. Immunohistochemical staining with monoclonal antibodies against Ras and p53 identified the PR cells and highlighted the fact that they were intermingled with mouse stromal cells (**Figures 4C** and **4D**).

To address the possibility that the less efficient tumor formation by the PR cells in the subcutaneous site was due to tissue microenvironment, we considered the angiogenesis which is an important factor influencing the cell engraftment. Surface blood vessels were not apparent and the tumors appeared as white masses (**Figure 4A**). Few blood vessels were observable on the skin flap (**Figure 4A**). Intratumoral vessels were visualized by staining endothelial cells for CD31 and revealed a dense vascular network throughout the tumors, composed of capillaries without any large caliber vessels (**Figure 4E**). Therefore, the lack of

nutrients and oxygen could not account for the different behavior of the PR cells in the two sites (subcutaneous and subrenal capsule). We then reasoned that the restricted growth of the tumors might be explained by a default in the capacity of those cells to proliferate in an adverse environment. To test this option, we analyzed the proliferation rate of these tumors by immunohistochemistry with monoclonal antibody against Ki-67. Surprisingly, we noticed some areas intensively labeled throughout the tumor while some others were devoid of proliferating cells (**Figure 4F**). The Ki-67 labeling index reached 20% (**Table 2**), value largely considered as suggestive for an ACC with poor prognosis in human pathology (Allolio et al., 2004). To further characterize these tumors, we checked whether their behavior – restricted growth despite a high proliferative index – resulted from an increased apoptosis. The detection of apoptotic cells by TUNEL assay showed numerous apoptotic cells (**Figure 4G**), indicating that increased apoptosis explained at least in part the observed non growing tumors.

The effect of subcutaneous transplantation was also investigated on tumor-associated formation of lymphatic vessels with antibody against LYVE-1. Interestingly, no intratumoral or peritumoral lymphatic vessels were observed (**Figure 4E**). Despite extensive search, no signs of metastatic spread were found at any organs where PR cells metastasized when implanted beneath the kidney capsule. The direct role of lymphangiogenesis in tumor progression is being increasingly appreciated through studies of murine as well as human cancers (Cao, 2005). Our finding that PR cells induce lymphangiogenesis only when they are transplanted beneath the kidney capsule, correlated well with their metastatic ability. Hence, the same set of introduced transforming genes elicited quite different tumor behavior according to the site of transplantation. The subcutaneous transplantation allowed the PR cells to survive but not to express their fully tumorigenic potential.

### **p53<sup>DD</sup> or Ras<sup>G12V</sup> alone are not sufficient to transform adrenocortical cells into a tumorigenic state**

We have previously shown that the model of cell transplantation allows us to demonstrate that aberrant expression of non-mutated G protein-coupled receptor genes was sufficient to initiate the formation of benign adrenocortical tumors associated with Cushing syndrome features and thus, to mimic human adrenocortical disease (Mazzuco et al., 2006a; Mazzuco et al., 2006b). Taken advantage of the possibility of examine non malignant phenotype, we studied cells that had been singly transduced with p53<sup>DD</sup> or Ras<sup>G12V</sup> retroviruses. Following cell transplantation, P cells formed small tissue spread between the kidney parenchyma and the capsule as seen in

cross-section (**Figure 5A**). P tissue presented a uniform structure of regular eosinophilic adrenocortical cells with no invasive properties with respect to the renal parenchyma and expressed the transduced gene (**Figures 5B** and **5C**). Examination of Ki-67 expression in sections showed that the transplanted cells had a low proliferation rate (**Figure 5D** and **Table 2**). In sharp contrast, R cells gave rise to a voluminous mass tissue. Cross-sections of the tissue were about 20 times larger than those of P tissue, and compression of the renal parenchyma was visible (**Figure 5A**). Under microscopic examination, the R cells appeared to have formed a heterogenous hyperplastic expanding mass with an irregular architecture, cellular pleiomorphism and some nuclear atypia, and without necrosis (**Figures 5B** and **5C**). The boundary between adrenocortical cells and the renal surface was preserved with no sign of invasion. The proliferation rate of the R cells in the transplant tissues was intermediate between that measured in P tissue and in PR tissue (**Figure 5D** and **Table 2**). Both tissues were vascularized (**Figure 5E**) and functional as emphasized by the cortisol production (**Data not shown**) and by the detection of the 3 $\beta$ HSD (**Figure 5F**) and thus, permitted the survival of the host adrenalectomized animals.

The formation of a hyperplastic tissue from singly transduced R cells contrasted with previously reported results (Thomas et al., 2002a). Indeed, the tissue formed following the transplantation beneath the kidney capsule of Ras<sup>G12V</sup> expressing-adrenocortical cells, had also an abnormal histological appearance and had a low proliferation rate resembling that measured in tissue formed from normal non-genetically modified cells. To address the possibility that an additional mutation may explain the observed phenotype, we prepared independently two others polyclonal R populations. In 100% of the mice injected, the tissue formed after the transplantation was a hyperplasia with the same biological characteristics that the first R cells (Figure 6). One possible explanation is that the pLNCX2-Ras<sup>G12V</sup> retroviral plasmid used in the present experiment allowed a more homogeneous and sustained level of expression of Ras<sup>G12V</sup> than the pBabe-Hygro-Ras<sup>G12V</sup> used in the previous study (Thomas et al., 2002a). The ability to form functional tissues from cells expressing Ras<sup>G12V</sup> contrasted with the reported effect that high levels of ectopic activated Ras protein may result in premature senescence (Serrano et al., 1997). Therefore, there may exist a selection against cells overexpressing Ras<sup>G12V</sup>, leaving a population with moderate expression of activated oncogene. The level of Ras expression is then sufficient to activate one or more of the downstream signaling pathways controlled by Ras, such as the MAP kinase or the PI3 kinase pathways to a level that is essential to disrupt the fine balance between the differentiation and proliferation, and to trigger some irreversible changes towards a benign phenotype.

### **The order of acquisition of genetic alterations is a critical determinant for the tumor phenotype**

Simultaneous activation of Ras oncogene and inactivation of p53 tumor suppressor deregulated transcriptional programs that conferred PR adrenocortical cells a tumorigenic potential when transplanted into mice. However, the exact importance of the order of acquisition of these genetic events on the cancer phenotype, which may be of great consequence, has not yet been clearly established. It was proposed that multiple alternative genetic pathways may lead to the creation of a primary tumor and that the characteristics of a tumor may vary, depending on the pathway chosen (Bernards and Weinberg, 2002). To address that important issue, primary cells were successively transduced with two retroviruses. After each infection, successfully transduced polyclonal cell population was obtained by selection with the appropriate antibiotic. Thus, singly transduced R cells were infected with p53<sup>DD</sup> retroviruses (R+P) and conversely, singly transduced P cells were infected with Ras<sup>G12V</sup> retroviral particles (P+R) (**Figure 6A**). The control for each doubly transduced cells were prepared by using the empty vector used to clone the second transgene, establishing two populations termed P+pL and R+pB (**Figure 6A**). The resultant four polyclonal cell populations were confirmed to express at a similar level the desired transgenes by RT-PCR amplification (**Figure 6B**).

The P+pL and R+pB control cell populations were indistinguishable from their P and R counterparts in terms of cell morphology and proliferation capacity *in vitro*, as well as in their ability to form steroidogenic tissue once transplanted (**Figure 6C** and **Data not shown**). Interestingly, the introduction of an empty vector and the longer time in culture requested for efficient selection did not altered the phenotype expressed by these cells, indicating that no additional genetic changes have appeared during the process of generating these cells. *In vitro*, all cell populations but R+P cells showed a similar morphological appearance reminiscent of primary adrenocortical cells (**Figure 6C**), whereas the R+P cell population displayed small cells not sensitive to contact inhibition and form multilayered foci in culture (**Figures 6C**). We next tested whether the order of introduction of the genetic alterations may influence cell proliferation. The expression of constitutively active H-Ras followed by inactivation of wild-type p53 conferred to the cells a proliferation capacity similar to the PR cells (**Figure 6D**). In contrast, the reverse order of gene transduction resulted in a marked reduction in cell proliferation capacity (**Figure 6D**). To further characterize these cells, the proliferation was determined by the percentage of Ki-67 positive cells in each cell population. The R+P cell population maintained in defined medium displayed a percentage of cells

engaged in the cell cycle close to the percentage measured in PR cells, suggesting an almost complete independence from extrinsic mitogens for proliferation (**Figure 6E**). Conversely, the P+R cells exhibited a reduced proliferation index in absence of mitogens and thus, a stronger dependence to growth factors (**Figure 6E**). Therefore, in cells with defective p53 signaling, oncogenic Ras as second genetic hit is not able to substitute for a mitogenic signal to the cell cycle. When the respective abilities of the R+P and P+R cells to form colonies in soft agar were compared, we found that the R+P cells were as efficient as the PR cells whereas the P+R were as efficient as the R cells (**Table 1**). We then concluded from these experiments that R+P cells were transformed since they expressed in their phenotype all the *in vitro* characteristics ascribed to transformed cells *i.e.*, to proliferate in absence of extrinsic mitogens and in absence of anchorage, and to form colonies within monolayers of contact-inhibited cells.

The transplantation of R+P cells resulted in tumors highly neoplastic (**Figures 7A and 7B**), proliferative (**Figure 7C**), poorly differentiated and invading into kidney parenchyma and adjacent organs such as muscle, pancreas and adipose tissue (**Data not shown**). At the time of necropsy, the primary tumors spread from the kidney to the spleen, abdominal muscle, intestinal mesentery and diaphragm (**Figures 7F to 7I**). Therefore, we conclude that R+P polyclonal cell population was as potent as PR cells to induce the formation of a metastatic adrenocortical carcinoma. In sharp contrast, the tissues formed following the transplantation of P+R cells were not malignant. Nevertheless, the tissue formed was a benign hyperplasia with no signs of kidney parenchyma invasion (**Figure 7K**) and metastases. The number of Ki-67 positive cells was lower as compared to the R+P tumors (**Figures 7C and 7L**). This milder phenotype in P+R tissues could not be due to a difference in the level of expression of both transgenes as the levels of expression of p53<sup>DD</sup> and Ras<sup>G12V</sup> were very similar in PR, R+P and P+R (**Figures 7D, 7E, 7M and 7N**). When the respective ability of R+P and P+R tissues to develop lymphatics was compared, a close correlation with the metastatic potential was found (**Figures 7J and 7O**).

To our knowledge, no other study has derived cell cultures from the same batch of initial cells and, after transduction with defined genetic elements in different orders, evaluated their effects on the expressed phenotype in an *in vivo* experimental model. Taken together, these findings show that malignant progression in ACTs might be associated not only with the acquisition of molecular genetic changes but also and more importantly with the order of acquisition. Sun et al. noted that the order of introduction of Ras<sup>G12V</sup> and LT did not affect the outcome of the transplantation; both cell populations formed very aggressive tumors (Sun et

al., 2004). One possible explanation is that LT being such powerful viral oncoprotein, the requirement for cooperation with Ras<sup>G12V</sup> might be minimal whatever the order of acquisition was. Currently, we do not know how the order of acquisition of genetic alterations impact on the underlying mechanism of cooperation leading to different tumor phenotypes. Finally, whether this model can also be applied to other tissue type remains to be seen.

## Conclusion

These experiments establish a new *in vivo* system for understanding the pathogenesis of ACTs. Starting with primary adrenocortical cells isolated from bovine adrenal glands, we have succeeded in transforming such cells to tumorigenicity through the perturbation of a limited number of pathways. Significantly, the biological behavior of such transformed cells depended on the specific order of acquisition of alterations. In this tissue reconstruction model, each singly infected cell population produced a distinctive phenotype.

The genetic elements used in these experiments have been shown to be mutated in human ACTs. *TP53* mutations have been found in 20 to 33% of sporadic ACCs and never in ACAs (Libé et al., 2007; Ohgaki et al., 1993; Reincke et al., 1994; Sidhu et al., 2005). The presence of mutations in *TP53* is directly correlated to adverse prognostic outcome for the patients and therefore, probably occurs as a late event in tumor progression. Although the Ras gene is mutated in 12.5% of ACTs with an equal prevalence in ACAs and ACCs (Yashiro et al., 1994), EGFR, a known upstream activator of Ras signaling is overexpressed in 43% of ACAs and in almost 100% of ACCs (Kamio et al., 1990; Sasano et al., 1994). Moreover, TGF $\alpha$ , a natural ligand for EGFR is often found overexpressed in ACCs (Sasano et al., 1994).

Thus far, we have employed this model system to improve our understanding of the genetic changes leading to the initiation and progression of adrenocortical cancer, to identify cooperating events in malignancy by using different combinations of genes that are thought to contribute to cancer development and to shed some light on the critical importance of the order of genetic alterations for the tumor development. We have focused on Ras and p53 genes because modification in their expression and/or in their genomic sequence is commonly present in human ACTs. Other genes such as *IGF-2*,  *$\beta$ -catenin*, *H19*, *p57*, *EGFR* have also been shown to play a role in adrenal pathogenesis and need to be tested in further studies. Thus, the system that we established will enable us to test the oncogenic potential of these genes singly or in combination, in order to identify those that might truly contribute to the adrenocortical tumor development and those that might be only bystanders. We are confident that other genes combinations will yield to ACTs development with some specific clinical and



histopathological features and it will be then possible to link the genotypes with the tumor type. Finally, the first identification of the minimal combination of two master pathways sufficient to trigger ACC development will help to design new therapeutic options targeting their gene products or the downstream targets of their signaling pathways.

## Experimental procedures

### Plasmid construction and retroviral particles production

The *H-Ras*<sup>G12V</sup> cDNA previously inserted into pBabe-Hygro (a gift from Pr. J.W. Shay; (Morales et al., 1999)), was subcloned into the mouse Moloney Leukemia Virus derived vector pLNCX2 (Clontech, Palo Alto, CA), downstream of its immediate early cytomegalovirus promoter. A dominant negative p53 fragment, p53<sup>DD</sup>, was purchased already cloned into pBabe-Hygro (Addgene plasmid 9058) (Hahn et al., 2002). pLNCX2-Ras<sup>G12V</sup> (resistant to neomycin) and pBabe-Hygro-p53<sup>DD</sup> (resistant to hygromycin) constructs and the corresponding empty retroviral vectors were used to transfect the amphotropic packaging cell line PT67 (Clontech, S<sup>T</sup> Germain-en-Laye, France) using the Effecten<sup>®</sup> Transfection Reagent (Life Technologies Invitrogen, Cergy- Pontoise, France). The cells underwent selection with 400 µg/ml neomycin for 10 days or 50 µg/ml hygromycin for 6 days. Then the viral supernatant was collected and filtered through a 0.45 µm syringe filter to obtain cell-free viruses for adrenocortical cell infection.

### Culture of bovine adrenocortical cells and retroviral transduction

Primary adrenocortical cells were prepared by dissection and enzymatic digestion of adrenal glands from 2-yr-old steers, as previously described (Duperray and Chambaz, 1980). They were grown at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub>-95% air atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's F-12 1:1 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 10% horse serum and 1% (v/v) UltroSer<sup>®</sup> G (BioSeptra, Cergy-Saint-Christophe, France) (complete medium). Reaching 40–50% confluence, adrenocortical cells were infected by a mix of two retroviral suspensions for 24 hours (pBabe-Hygro-p53<sup>DD</sup>/pLNCX2 or pLNCX2-Ras<sup>G12V</sup>/pBabe-Hygro or pBabe-Hygro-p53<sup>DD</sup>/pLNCX2-Ras<sup>G12V</sup>). Infected cells were selected with 400 µg/ml neomycin for at least 7 days and 50 µg/ml hygromycin for 5 days to obtain stable cell lines.

In different experiments, primary cells were transduced with a single retrovirus, pBabe-Hygro-p53<sup>DD</sup> or pLNCX2-Ras<sup>G12V</sup> and selected with 50 µg/ml hygromycin for 5 days or 400 µg/ml neomycin for at least 7 days, respectively. Stably infected cultures were then infected with either pLNCX2 or pLNCX2-Ras<sup>G12V</sup>, or pBabe or pBabe-Hygro-p53<sup>DD</sup>, respectively, and selected with 400 µg/ml neomycin and 50 µg/ml hygromycin for 5 days to obtain stable cell lines. Cells were not grown extensively between the two infections.

Primary adrenocortical cells transduced only with the empty vectors pLNCX2 or pBabe were used in some experiments to compare with the control cells to exclude any modification due to the infection procedure.

### ***In vitro* analysis**

Gene expression analysis was assessed by RT-PCR. One microgram of total RNA of cultured cells, prepared using the RNagents<sup>®</sup> Total RNA Isolation System (Promega, Charbonnières, France), were reverse transcribed using the ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcriptase (Promega) with random primers PdN6 (Life Technologies Invitrogen); after which 2 µL of each reaction were PCR amplified using following primers: 5-ATGACGGAATATAAGCTGGTGGT and 5-TCAGGAGAGCACACACTTGC (Ras<sup>G12V</sup>), 5-AAAGGATGCCCATGCTACAG and 5-TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA (p53<sup>DD</sup>), and 5-GCGGCTATCGTGAAGAACATTG and 5-CCTTGCGTTTGAGAGCAGGG (RP-L27; Ribosomal Protein-L27).

Proliferation was determined by assessing relative cell accumulation in complete medium, for 7 days post-plating  $5 \times 10^3$  of each cell lines. Each day, cells were counting in triplicate using the Coulter<sup>®</sup> Z1 (Coultronics, Margency, France). Proliferation was also assessed by the percentage of Ki-67 positive cells in each cell population. For each cell lines,  $10 \times 10^4$  cells were plated in complete medium for 24 hours in two Labtek 4 chambers glass slide (Fisher Scientific, Pittsburg, PA). After a deprivation step of 48 hours in DMEM/0,1% FCS, half cells were transferred in complete medium and half were maintained in 0.1% FCS medium for 24 hours. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and immunostained with the monoclonal antibody MIB-1 (Dako, Trappes, France). Three groups of 100 adrenocortical cells were counting manually on each well slides,  $n = 4$  slides of each group.

$5 \times 10^3$  cells of individual cell lines were seeded in triplicates in soft agar and the resultant colonies were scored three weeks later. Each experiment was repeated at least once.

### **Cell transplantation and animal experimentation**

Immunodeficient ICR-Scid mice originally purchased from Taconic (Germantown, NY), both males and females, at an age greater than 6 weeks (~25 g body weight) were used in these experiments. All procedures were conducted according to the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. Mice were adrenalectomized and  $2 \times 10^6$  genetically modified adrenocortical cells were transplanted under the kidney capsule, as previously described (Thomas and Hornsby, 1999; Thomas et al., 1997). The cell transplantation procedure was performed under tribromoethanol anesthesia. Following transplantation of the cells, postoperative care for the

animals, including the administration of analgesics and antibiotics, was as previously described (Thomas et al., 1997). Animals were killed at various times, from 8 to 35 days after transplantation and subjected to necropsy.

For xenograft assays,  $2 \times 10^6$  genetically modified adrenocortical cells were injected subcutaneously into the flank of mice. Animals were sacrificed three months following injection. Four or more mice were used per polyclonal cell population.

### **Histological and immunohistochemical analysis**

All tissues (xenografts, adrenocortical transplants and metastases) were fixed in 4% paraformaldehyde and paraffin embedded. Microtome sections (5  $\mu$ m thick) were stained with Hematoxylin & Eosin for histological analysis. Transduced-genes expression was performed by standard immunohistochemistry (IHC) using the primary antibodies mouse monoclonal anti H-Ras (clone 18; BD Transduction Laboratories, Lexington, KY) and mouse monoclonal anti p53 (clone pAb421; Calbiochem, Nottingham, UK), detected with biotin-conjugated anti-mouse antibody and avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA), as recommended by the manufacturer. Sections were lightly counterstained with hematoxylin. Differentiation status and proliferation index of tissues were realized with the same method of IHC as described above, using a polyclonal antibody anti 3 $\beta$ HSD (produces in our laboratory) and the monoclonal antibody MIB-1 (Dako) that recognizes the proliferation-associated Ki-67 antigen. The number of Ki-67-positive cells per 100 adrenocortical cells was designated as the labelling index. Counting was performed manually, using two nonconsecutive tissue sections per tissue sample, selected at random,  $n = 10$  sections (from five transplanted tissues) of each group. DNA fragmentation associated with apoptosis was detected by nick end labelling of sections using the TdT-FragEL<sup>TM</sup> kit (TUNEL) (Calbiochem), in accordance with the manufacturer's instructions. Vascular endothelial cells were labeled with rat monoclonal anti-CD31 (PECAM-1, clone MEC13.3; BD Biosciences, Pont-de-Claix, France) and Lymphatic endothelial cells were labeled with goat polyclonal anti-LYVE 1 (R&D Systems, Lille, France), on paraffin embedded sections (5  $\mu$ m thick) of tissues fixed in Accustain<sup>®</sup> Formalin Free Fixative (Sigma-Aldrich, S<sup>T</sup> Louis, US). Secondary antibodies were Cy3- or FITC-labeled donkey anti-rat or anti-goat respectively. Sections were counterstained with DAPI.

## **Acknowledgments**

This work was supported by INSERM, CEA (DSV/iRTSV/LAPV U878), Fondation de France (research grant 2004012837 to M.T.) and Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Grant AOM 02068) to the COMETE Network.

## References

- Abercrombie, M. (1979). Contact inhibition and malignancy. *Nature* 281, 259-262.
- Achen, M. G., Mann, G. B., and Stacker, S. A. (2006). Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *British journal of cancer* 94, 1355-1360.
- Achen, M. G., and Stacker, S. A. (2006). Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread- new players begin to emerge. *Int J Cancer* 119, 1755-1760.
- Adamczewski, J. P., Gannon, J. V., and Hunt, T. (1993). Simian virus 40 large T antigen associates with cyclin A and p33cdk2. *Journal of virology* 67, 6551-6557.
- Allolio, B., and Fassnacht, M. (2006). Adrenocortical Carcinoma: Clinical Update. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2027-2037.
- Allolio, B., Hahner, S., Weismann, D., and Fassnacht, M. (2004). Management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60, 273-287.
- Angeli, A., Osella, G., Ali, A., and Terzolo, M. (1997). Adrenal incidentaloma: an overview of clinical and epidemiological data from the National Italian Study Group. *Hormone research* 47, 279-283.
- Avantaggiati, M. L., Carbone, M., Graessmann, A., Nakatani, Y., Howard, B., and Levine, A. S. (1996). The SV40 large T antigen and adenovirus E1a oncoproteins interact with distinct isoforms of the transcriptional co-activator, p300. *The EMBO journal* 15, 2236-2248.
- Bardeesy, N., and DePinho, R. A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2, 897-909.
- Barzon, L., Chilosi, M., Fallo, F., Martignoni, G., Montagna, L., Palu, G., and Boscaro, M. (2001). Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. *Eur J Endocrinol* 145, 207-212.
- Bernard, M. H., Sidhu, S., Berger, N., Peix, J. L., Marsh, D. J., Robinson, B. G., Gaston, V., Le Bouc, Y., and Gicquel, C. (2003). A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 998-1001.
- Bernards, R., and Weinberg, R. A. (2002). A progression puzzle. *Nature* 418, 823.
- Boehm, J. S., Hession, M. T., Bulmer, S. E., and Hahn, W. C. (2005). Transformation of human and murine fibroblasts without viral oncoproteins. *Mol Cell Biol* 25, 6464-6474.
- Cao, Y. (2005). Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer* 5, 735-743.
- Duperray, A., and Chambaz, E. M. (1980). Effect of prostaglandin E1 and ACTH on proliferation and steroidogenic activity of bovine adreno-cortical cells in primary culture. *Journal of steroid biochemistry* 13, 1359-1364.
- Fagotto, F., and Gumbiner, B. M. (1996). Cell contact-dependent signaling. *Developmental biology* 180, 445-454.

- Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Gazdar, A. F., Butel, J. S., and Carbone, M. (2002). SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* 2, 957-964.
- Grumbach, M. M., Biller, B. M., Braunstein, G. D., Campbell, K. K., Carney, J. A., Godley, P. A., Harris, E. L., Lee, J. K., Oertel, Y. C., Posner, M. C., *et al.* (2003). Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). *Ann Intern Med* 138, 424-429.
- Gupta, G. P., and Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.
- Hahn, W. C., Dessain, S. K., Brooks, M. W., King, J. E., Elenbaas, B., Sabatini, D. M., DeCaprio, J. A., and Weinberg, R. A. (2002). Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol Cell Biol* 22, 2111-2123.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hornsby, P. J., Thomas, M., Northrup, S. R., Popnikolov, N. K., Wang, X., Tunstead, J. R., and Zheng, J. (1998). Cell transplantation: a tool to study adrenocortical cell biology, physiology, and senescence. *Endocr Res* 24, 909-918.
- Kamio, T., Shigematsu, K., Sou, H., Kawai, K., and Tsuchiyama, H. (1990). Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma. *Human pathology* 21, 277-282.
- Kendall, S. D., Linardic, C. M., Adam, S. J., and Counter, C. M. (2005). A network of genetic events sufficient to convert normal human cells to a tumorigenic state. *Cancer research* 65, 9824-9828.
- Kirschner, L. S. (2006). Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 14-21.
- Koch, C. A., Pacak, K., and Chrousos, G. P. (2002). The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5367-5384.
- Libé, R., and Bertherat, J. (2005). Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. *Eur J Endocrinol* 153, 477-487.
- Libé, R., Groussin, L., Tissier, F., Elie, C., Rene-Corail, F., Fratticci, A., Jullian, E., Beck-Peccoz, P., Bertagna, X., Gicquel, C., and Bertherat, J. (2007). Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin Cancer Res* 13, 844-850.

- Lill, N. L., Tevethia, M. J., Eckner, R., Livingston, D. M., and Modjtahedi, N. (1997). p300 family members associate with the carboxyl terminus of simian virus 40 large tumor antigen. *Journal of virology* 71, 129-137.
- Manfredi, J. J., and Prives, C. (1994). The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* 1198, 65-83.
- Mazzuco, T. L., Chabre, O., Feige, J. J., and Thomas, M. (2006a). Aberrant expression of human luteinizing hormone receptor by adrenocortical cells is sufficient to provoke both hyperplasia and Cushing's syndrome features. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 196-203.
- Mazzuco, T. L., Chabre, O., Sturm, N., Feige, J. J., and Thomas, M. (2006b). Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. *Endocrinology* 147, 782-790.
- Morales, C. P., Holt, S. E., Ouellette, M., Kaur, K. J., Yan, Y., Wilson, K. S., White, M. A., Wright, W. E., and Shay, J. W. (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 21, 115-118.
- Moran, E. (1993). DNA tumor virus transforming proteins and the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* 3, 63-70.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., and Heitz, P. U. (1993). p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer* 54, 408-410.
- Paulovich, A. G., Toczyski, D. P., and Hartwell, L. H. (1997). When checkpoints fail. *Cell* 88, 315-321.
- Prevo, R., Banerji, S., Ferguson, D. J., Clasper, S., and Jackson, D. G. (2001). Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem* 276, 19420-19430.
- Reinke, M., Karl, M., Travis, W. H., Mastorakos, G., Allolio, B., Linehan, H. M., and Chrousos, G. P. (1994). p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 790-794.
- Sasano, H., Suzuki, T., Shizawa, S., Kato, K., and Nagura, H. (1994). Transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor expression in normal and diseased human adrenal cortex by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Mod Pathol* 7, 741-746.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Shaulian, E., Zauberman, A., Ginsberg, D., and Oren, M. (1992). Identification of a minimal transforming domain of p53: negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol* 12, 5581-5592.
- Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., and Der, C. J. (2000). Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol* 10, 147-154.



Sidhu, S., Martin, E., Gicquel, C., Melki, J., Clark, S. J., Campbell, P., Magarey, C. J., Schulte, K. M., Roher, H. D., Delbridge, L., and Robinson, B. G. (2005). Mutation and methylation analysis of TP53 in adrenal carcinogenesis. *Eur J Surg Oncol* 31, 549-554.

Smale, S. T., and Tjian, R. (1986). T-antigen-DNA polymerase alpha complex implicated in simian virus 40 DNA replication. *Mol Cell Biol* 6, 4077-4087.

Soon, P. S., McDonald, K. L., Robinson, B. G., and Sidhu, S. B. (2008). Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *The oncologist* 13, 548-561.

Sun, B., Huang, Q., Liu, S., Chen, M., Hawks, C. L., Wang, L., Zhang, C., and Hornsby, P. J. (2004). Progressive loss of malignant behavior in telomerase-negative tumorigenic adrenocortical cells and restoration of tumorigenicity by human telomerase reverse transcriptase. *Cancer research* 64, 6144-6151.

Thomas, M., and Hornsby, P. J. (1999). Transplantation of primary bovine adrenocortical cells into scid mice. *Mol Cell Endocrinol* 153, 125-136.

Thomas, M., Northrup, S. R., and Hornsby, P. J. (1997). Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands. *Nat Med* 3, 978-983.

Thomas, M., Suwa, T., Yang, L., Zhao, L., Hawks, C. L., and Hornsby, P. J. (2002a). Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis: a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells. *Neoplasia* (New York, NY 4, 493-500.

Thomas, M., Wang, X., and Hornsby, P. J. (2002b). Human adrenocortical cell xenotransplantation: model of cotransplantation of human adrenocortical cells and 3T3 cells in scid mice to form vascularized functional tissue and prevent adrenal insufficiency. *Xenotransplantation* 9, 58-67.

Thomas, M., Yang, L., and Hornsby, P. J. (2000). Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase. *Nature biotechnology* 18, 39-42.

Troyer, D. A., Mubiru, J., Leach, R. J., and Naylor, S. L. (2004). Promise and challenge: Markers of prostate cancer detection, diagnosis and prognosis. *Disease markers* 20, 117-128.

Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9, 138-141.

Yashiro, T., Hara, H., Fulton, N. C., Obara, T., and Kaplan, E. L. (1994). Point mutations of ras genes in human adrenal cortical tumors: absence in adrenocortical hyperplasia. *World journal of surgery* 18, 455-460; discussion 460-451.

Soft Agar assay	
PR	191 ± 5
P	0
R	47 ± 3
R+P	106 ± 2
P+R	36 ± 2

**Table 1.** Anchorage-independent growth of the adrenocortical cells expressing the indicated transgenes. The number of soft agar colonies was determined 3 weeks after  $5 \times 10^3$  cells were seeded in triplicate. Results are expressed as the mean of three experiments +/- SD.

Ki-67 Labeling Index	
pLNCX2	3.51 ± 1.04
P	4.57 ± 1.21
R	18.72 ± 3.25
PR	52.43 ± 6.66
PR (subcutaneous)	19,83 ± 4.36

**Table 2.** Ki-67 Labeling index in tissues formed following the transplantation beneath the kidney capsule of  $2 \times 10^6$  cells expressing the indicated transgènes.

## Legends of Figures

**Figure 1.** *In vitro* characterization of bovine adrenocortical cells transduced simultaneously with p53<sup>DD</sup> and Ras<sup>G12V</sup>

- A:** Summary of the experimental design for the generation of stably infected cell populations.
- B:** Detection of oncogenic Ras<sup>G12V</sup> and dominant negative p53<sup>DD</sup> by RT-PCR in adrenocortical cells transduced with either Ras<sup>G12V</sup> (R) or p53<sup>DD</sup> (P), or p53<sup>DD</sup> and Ras<sup>G12V</sup> (PR), or the empty retroviral vector pLNCX2 (pL). Total RP-L27 acts as loading control.
- C:** Phase-contrast images of the adrenocortical cells expressing the indicated transgenes or the empty retroviral vector pLNCX2.
- D:** Growth curves of P, R and PR cells. The cell proliferation rates were obtained by counting cells from triplicates cell culture every day. *Points*, mean; *bars*, SD.
- E:** Asynchronous populations of adrenocortical cells were cultured in normal culture medium or in defined medium containing 0.1% FCS. The percentage of cells into a cell cycle was determined by measuring Ki-67 labeling index.

**Figure 2.** Tumor growth analysis at day 8, 14 and 21 after transplantation of PR cells

After growth in culture, PR cells were transplanted beneath the kidney capsule of Scid mice.

- A:** Macroscopic appearance of kidney and xenografted tissue mass removed from the animals at day 8, 14, 21 after transplantation of  $2 \times 10^6$  PR cells. Adrenocortical tissue and kidney were cut transversally showing internal tissue expansion over time (arrows).
- B-E:** Paraffin embedded tissues were sectioned and H&E stained (scale bar, 400µm) (**B**); assayed for Ki67-positive (dark brown) cells (scale bar, 100µm) (**C**); or stained with an antibody against Ras (scale bar, 50µm) (**D**); or p53 (scale bar, 50µm) (**E**).

**Figure 3.** Malignant behavior of PR tumors at day 35

- A:** Appearance of a representative entire tumor masse found to have resulted from growth of transplanted PR cells at day 35.
- B:** The tumors were cut transversally and photographed, together with the host animal kidney.
- C-G:** Paraffin embedded tissues were sectioned and H&E stained (scale bar, 100µm) (**C**); or stained with an antibody against Ras (scale bar, 50µm) (**D**); or p53 (scale bar, 50µm) (**E**); or assayed for Ki-67-positive (dark brown) cells (scale bar, 100µm) (**F**); or apoptotic (light brown) cells by TUNEL assay (arrows; scale bar, 100µm) (**G**).
- H-J:** H&E coloration of tumor sections revealed invasion into adjacent tissues such as fat (scale bar, 100µm) (**H**); muscle (scale bar, 100µm) (**I**); or pancreas (scale bar, 50µm) (**J**).

**K:** Double CD31 (red) and LYVE-1 (green) immunofluorescent staining of the tumors to detect vascular and lymphatic vessels, respectively (scale bar, 25µm).

**L:** 3βHSD immunostaining of the tumors to detect adrenocortical-cortisol secreting cells (scale bar, 50µm).

**M-N:** Adrenocortical tumor spread to retroperitoneal organs. Arrows indicate PR cells spread to the spleen, diaphragm and mesentery (**M**); Paraffin embedded metastases were sectioned and stained with an antibody against Ras (scale bar, 400µm) (**N**).

**Figure 4.** Subcutaneous injection of PR cells produced less tumorigenic tissue

Two millions of PR cells were injected subcutaneously into the flank of Scid mice and animals were sacrificed three months following injection. The tissues formed (**A**) were paraffin embedded, sectioned and H&E stained (scale bar, 100µm) (**B**); or stained with an antibody against Ras (scale bar, 100µm) (**C**); or p53 (scale bar, 100µm) (**D**); or CD31 (red) and LYVE-1 (no green fluorescence detected) (scale bar, 50µm) (**E**); or assayed for Ki-67-positive (dark brown) cells (scale bar, 100µm) (**F**); or apoptotic (light brown) cells by TUNEL assay (arrows; scale bar, 100µm) (**G**).

**Figure 5.** Tissue formed from P and R cells transplantation

**A-D:** After growth in culture,  $2 \times 10^6$  P and R cells were transplanted beneath the kidney capsule of Scid mice. Animals were sacrificed at 35 days following cell transplantation. The tissues found to have resulted from growth of the transplanted cells were cut transversally (arrows) and photographed, together with the host kidney (**A**). Paraffin embedded tissues were sectioned and H&E stained (scale bar, 100µm) (**B**); stained with an antibody against Ras for R transplants or p53 for P transplants (scale bar, 100µm) (**C**); or assayed for Ki67-positive (dark brown) cells (scale bar, 100µm) (**D**).

**E:** Double CD31 (red) and LYVE-1 (no green fluorescent detected) immunofluorescent staining of tissues to detect vascular and lymphatic vessels, respectively (scale bar, 50µm).

**F:** 3βHSD immunostaining of the tissues to detect adrenocortical-cortisol secreting cells (scale bar, 50µm).

**Figure 6.** *In vitro* characterization of adrenocortical cells transduced with p53<sup>DD</sup> and Ras<sup>G12V</sup> in succession, and in various order

**A:** Summary of the experimental design for the generation of stably infected cell populations.

**B:** Detection of Ras<sup>G12V</sup> and p53<sup>DD</sup> by RT-PCR in adrenocortical cells transduced with the indicated transgenes. Total RP-L27 acts as loading control.

**C:** Morphological appearance of the indicated P+pL, R+pB, R+P and P+R cells.

**D:** Growth curves of R+P and P+R cells; for comparison R, P and PR growth curves have been plotted on the same graph. The cell proliferation rates were obtained by counting cells from triplicates cell culture every day. *Points*, mean; *bars*, SD.

**E:** Asynchronous populations of P+pL, R+pB, P+R and R+P cells were cultured in normal culture medium or in defined medium containing 0.1% FCS; for comparison R, P and PR Ki-67 labeling index have been plotted on the graph. The percentage of cells into a cell cycle was determined by measuring Ki-67 labeling index.

**Figure 7.** *In vivo* characterization of tissues formed following the transplantation of cells expressing either Ras<sup>G12V</sup>+p53<sup>DD</sup> or p53<sup>DD</sup>+Ras<sup>G12V</sup>

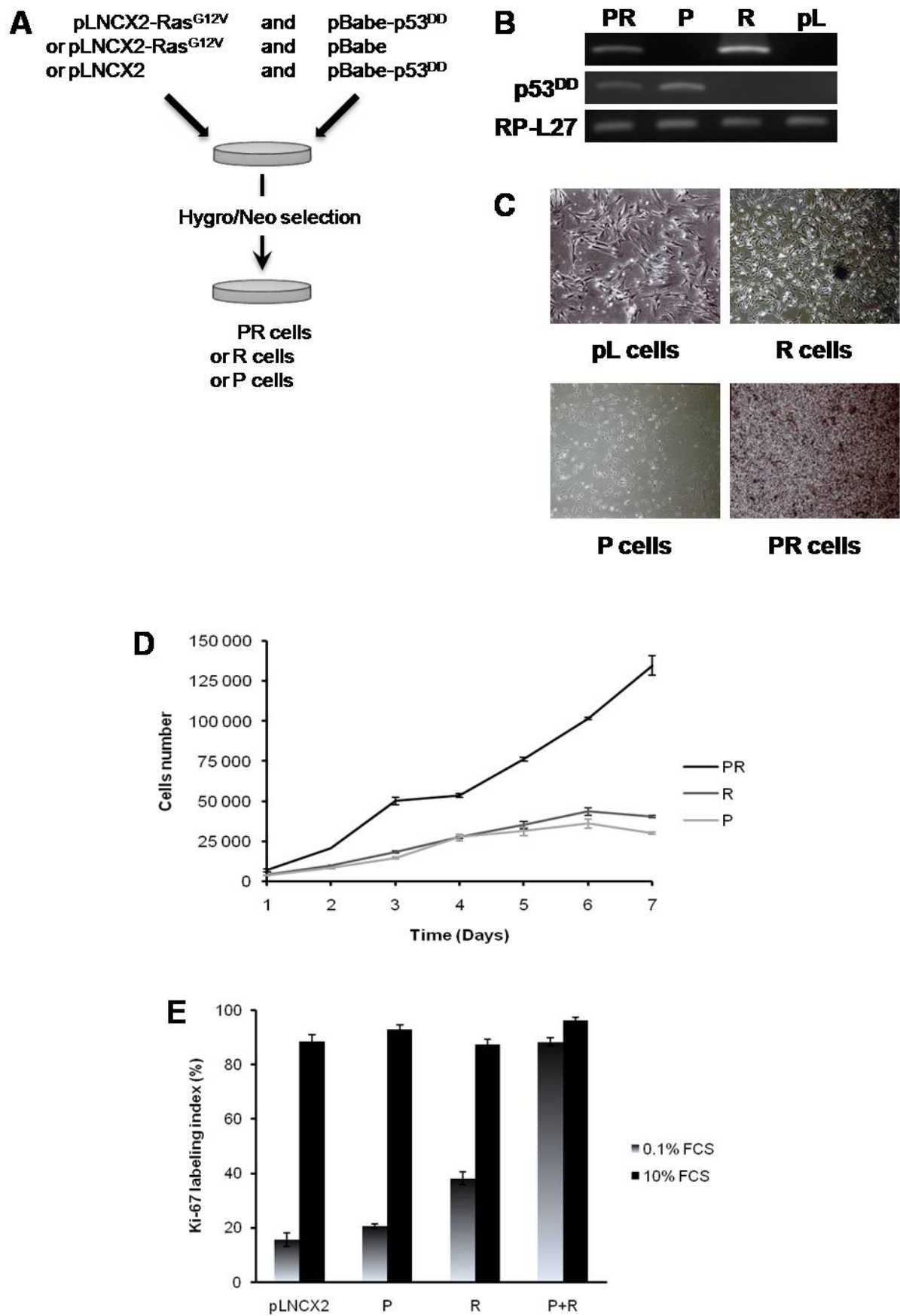
**A-E:** After growth in culture,  $2 \times 10^6$  R+P cells were transplanted under the kidney capsule of Scid mice. Macroscopic appearance of kidney and xenografted tissue mass removed from the animals at day 35 after cell transplantation (**A**); Adrenocortical tissue and kidney were cut transversally showing internal tissue above the kidney (arrows) (**B**). Paraffin embedded tissues were sectioned and assayed for Ki-67-positive (dark brown) cells (scale bar, 100µm) (**C**); or stained with an antibody against Ras (scale bar, 50µm) (**D**); or p53 (scale bar, 50µm) (**E**).

**F-I:** Macroscopic intraperitoneal tumor spread on the spleen of Scid mice after implantation of adrenocortical R+P cells (arrow) (**F**); and microscopic tumor spread in the abdominal muscle (H&E staining, scale bar, 400µm) (**G**); in the intestines, stained with an antibody against Ras (scale bar, 100µm) (**H**); and in the diaphragm, stained with an antibody against p53 (scale bar, 100µm) (**I**).

**J:** Double CD31 (red) and LYVE-1 (green) immunofluorescent staining of tumors to detect vascular and lymphatic vessels, respectively (scale bar, 50µm).

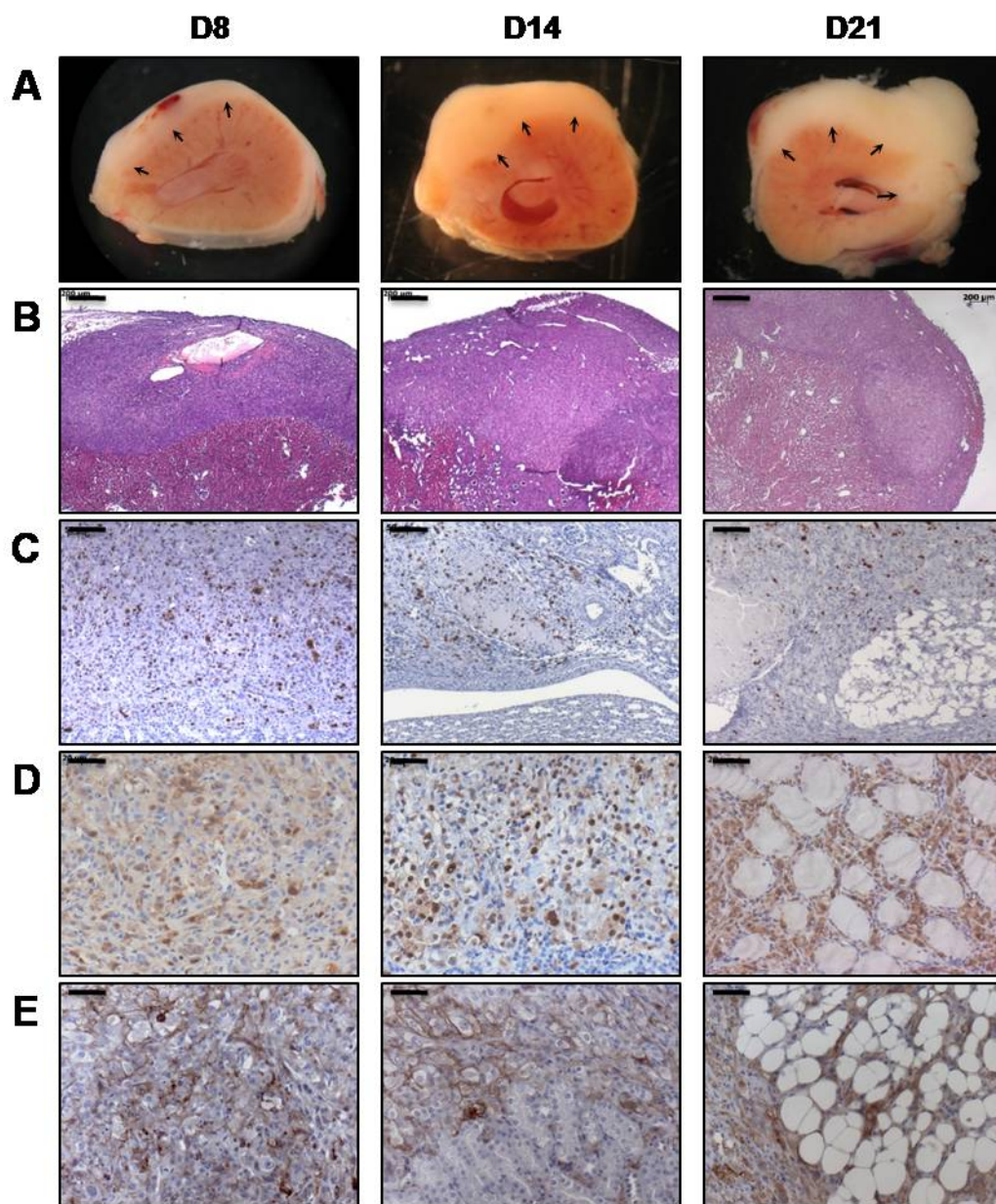
**K-N:** After growth in culture,  $2 \times 10^6$  P+R cells were transplanted under the kidney capsule of Scid mice. Animals were sacrificed at 35 days following cell transplantation. The entire tumor masses found to have resulted from growth of the transplanted cells were cut transversely (the tumor mass is the white part above the kidney; arrows) and photographed, together with the host animal kidney (**K**). Paraffin embedded tissues were sectioned and assayed for Ki-67-positive (dark brown) cells (scale bar, 50µm) (**L**); or stained with an antibody against Ras (scale bar, 50µm) (**M**); or p53 (scale bar, 50µm) (**N**).

**O:** Double CD31 (red) and LYVE-1 (no green fluorescent detected) immunofluorescent staining of transplants to detect vascular and lymphatic vessels, respectively (scale bar, 50µm).

**Figure 1**



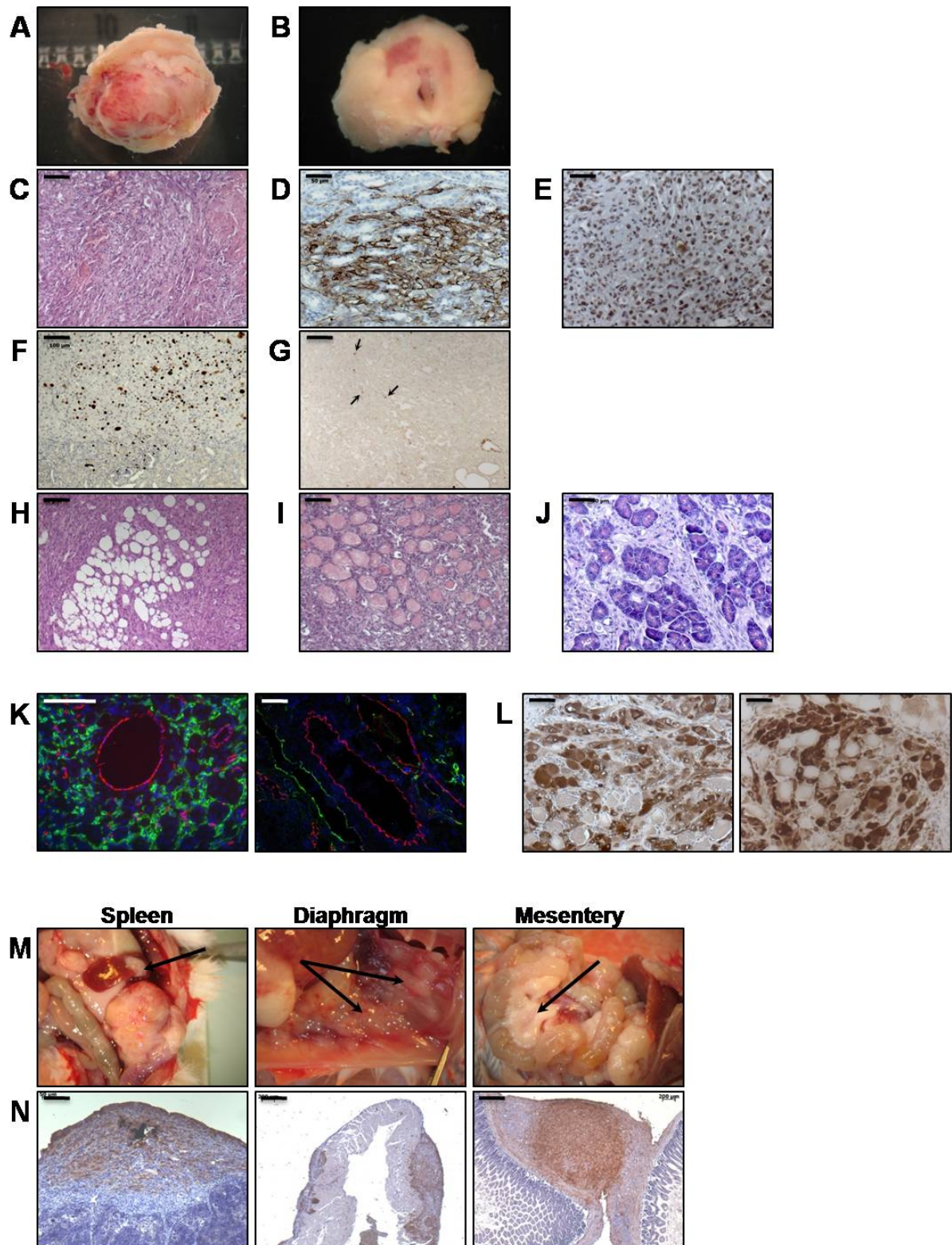
**Figure 2**





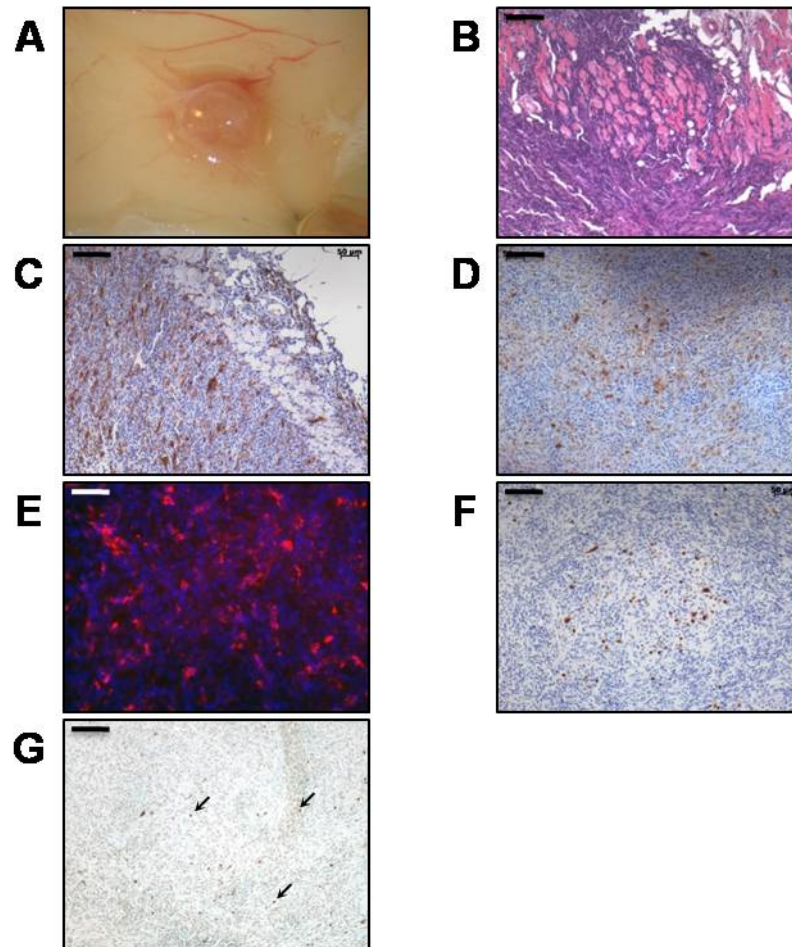


**Figure 3**





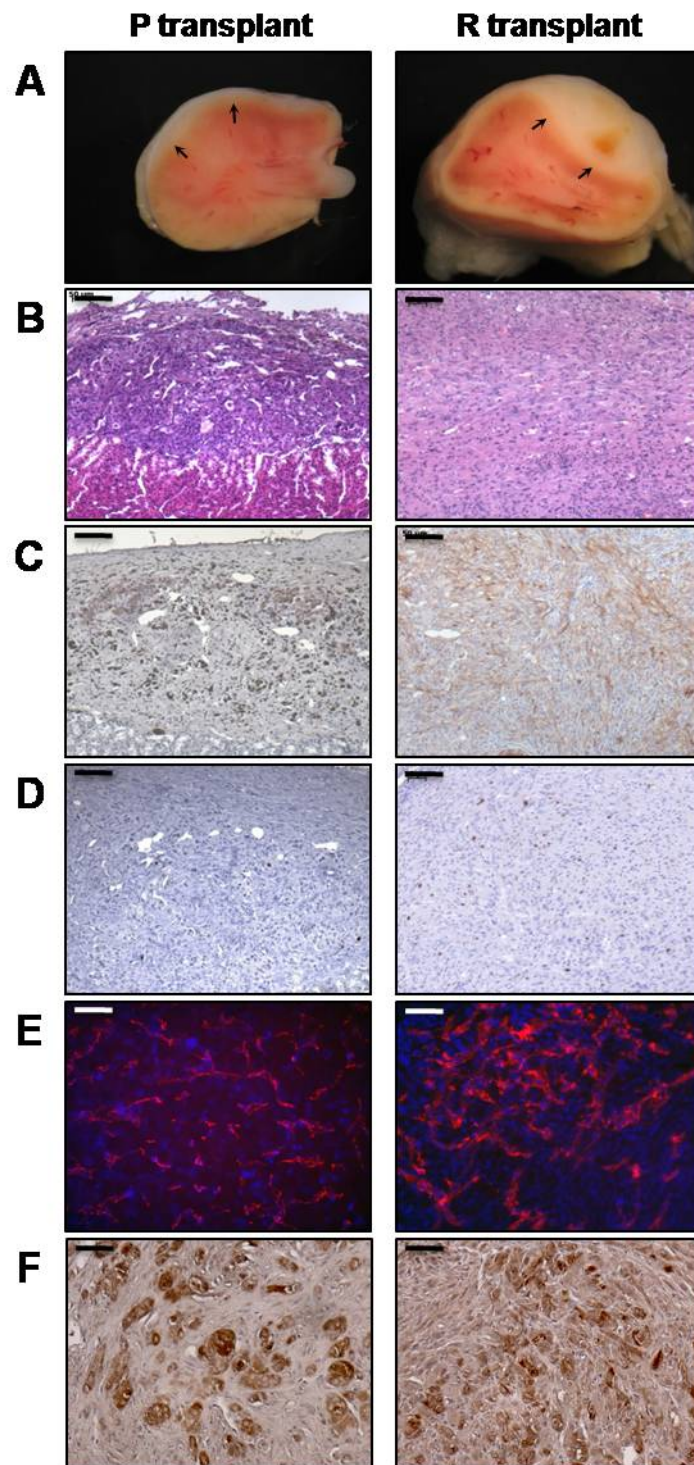
**Figure 4**







**Figure 5**





**Figure 6**

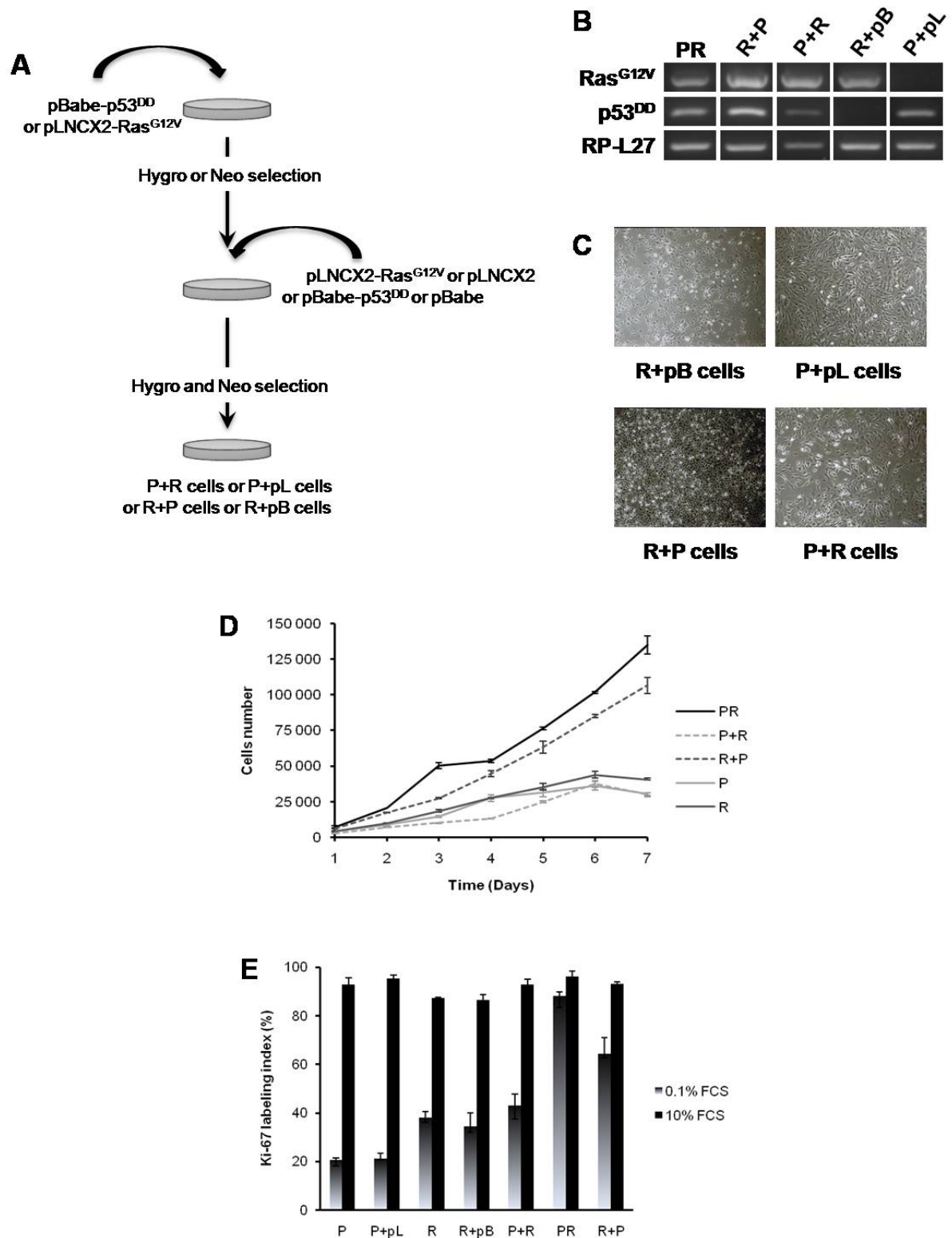
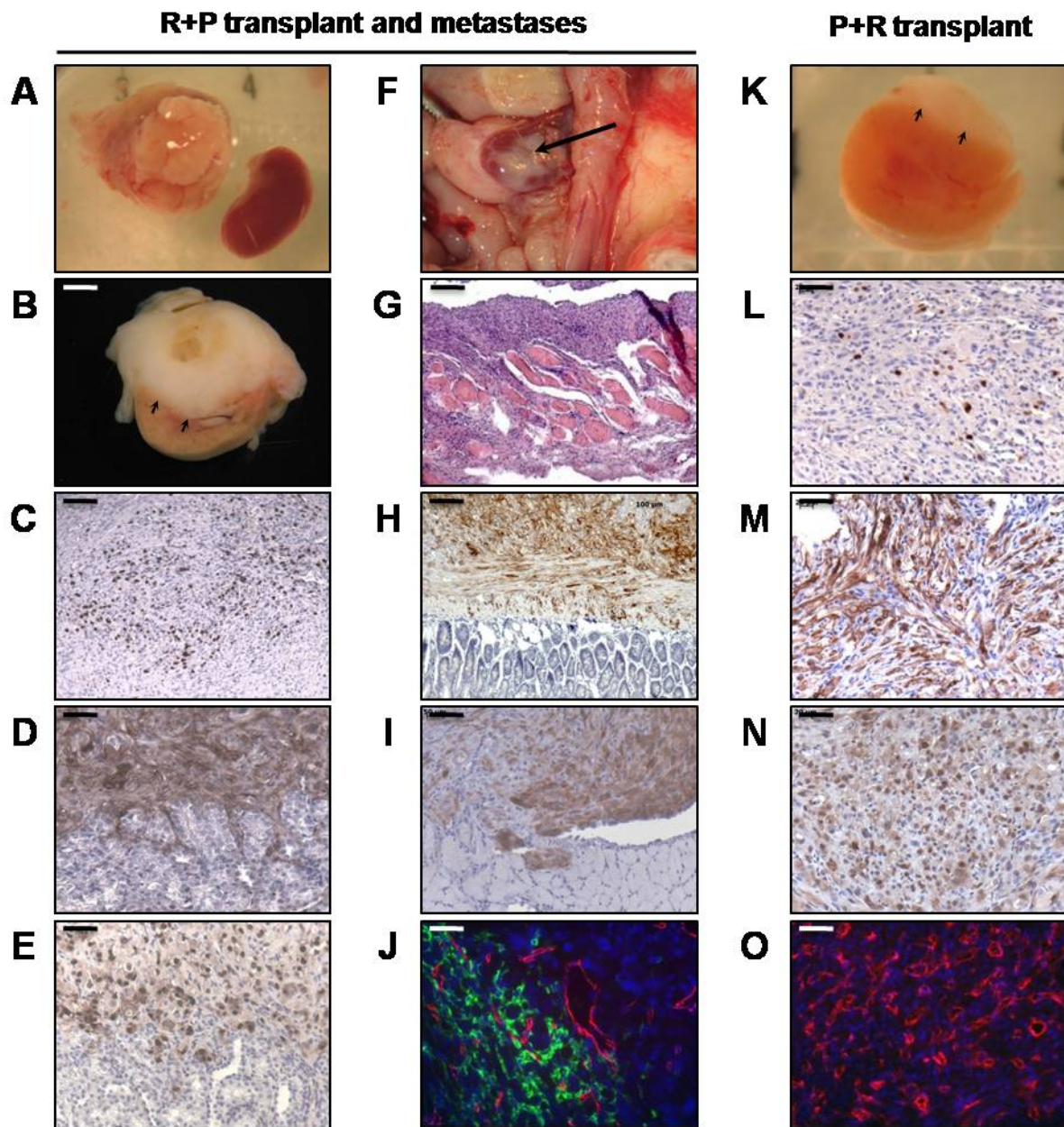






Figure 7





## 2.2 Discussion

Le présent travail a permis de transformer des cellules primaires de mammifères à longue espérance de vie, les BAC, en altérant seulement deux voies de signalisation, Ras et p53 par surexpression simultanée de Ras<sup>G12V</sup> et p53<sup>DD</sup> (PR). Après transplantation chez l'animal de cellules PR, un tissu malin s'est très rapidement développé, dès 8 jours post-opératoire. Ce tissu était fonctionnel, c'est-à-dire produisait le cortisol nécessaire à la survie des souris surrénalectomisées, très vascularisé et extrêmement prolifératif. La tumeur envahissait le rein et les tissus adjacents (graisse et muscle). Des métastases étaient visibles macroscopiquement au niveau du diaphragme, de la rate, du pancréas, du muscle abdominal ou du mésentère intestinal. La simple surexpression de Ras<sup>G12V</sup> (R) n'a pas induit une tumeur maligne mais une tumeur bénigne : le tissu était fonctionnel, vascularisé et relativement prolifératif mais non invasif. Enfin, la transplantation de cellules ne surexprimant que p53<sup>DD</sup> (P) a conduit à la formation d'un tissu apparemment normal, semblable à un tissu formé par des cellules BAC primaires.

Ces résultats *in vivo* se sont avérés être corrélés aux études *in vitro* : en condition de déprivation de sérum, 80% des cellules PR proliféraient alors que les cellules R ou P avaient un indice de prolifération de 40 et 20%, respectivement. Ces résultats montrent que les cellules P étaient complètement dépendantes des facteurs de croissance, que la surexpression de Ras<sup>G12V</sup> a induit une diminution de cette dépendance et que les cellules PR avaient acquis une totale indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance. De plus, et contrairement aux cellules R ou P, les cellules PR avaient perdu l'inhibition de contact en culture et étaient les seules à avoir formé des colonies viables en milieu semi-gélosé, deux propriétés de cellules transformées.

Par la suite, Ras<sup>G12V</sup> a été surexprimé dans des BAC P et p53<sup>DD</sup>, dans des BAC R, afin de produire, respectivement, des BAC Ras<sup>G12V</sup>+p53<sup>DD</sup> (R+P) ou p53<sup>DD</sup>+Ras<sup>G12V</sup> (P+R). Après transplantation, les BAC R+P ont effectivement induit la formation d'une tumeur maligne métastatique, identique à celle formée par les BAC PR, alors que les BAC P+R ont induit un phénotype bénin.

Grâce à cette étude, nous avons donc développé un modèle de tumorigenèse corticosurrénalienne présentant une progression tumorale multi-étapes au cours de laquelle des cellules primaires normales sont progressivement transformées en cellules bénignes puis en cellules malignes, suite à l'accumulation, dans un ordre défini, d'altérations génétiques : activation constitutive des voies de signalisation impliquant Ras, puis inactivation du gène suppresseur de tumeurs *TP53*.

### 3. SUREXPRESSION DE IGF-2 ET $\beta$ -CATÉNINE<sup>S37A</sup>

Il est à noter que l'ensemble des techniques utilisées pour l'étude des gènes *IGF-2* et  *$\beta$ -caténine* a été présenté dans la partie “Experimental procedures” de l'Article précédemment exposé. Les tissus prélevés ont tous été fixés dans du paraformaldéhyde 4% et inclus en paraffine pour réaliser les colorations Hématoxyline & Éosine, et diverses IHC.

#### 3.1 IGF-2 et Ras<sup>G12V</sup>

La surexpression très importante de *IGF-2* est l'anomalie la plus fréquemment retrouvée dans les carcinomes corticosurrénaux, dans environ 90% des cas (Ilvesmaki *et al.*, 1993b ; Gicquel *et al.*, 1997 ; Boulle *et al.*, 2001). Les réarrangements du locus 11p15, sur lequel est situé le gène codant pour IGF-2, sont également très communs dans les carcinomes mais relativement rare dans les adénomes (Gicquel *et al.*, 1994a). Ces données laissent donc à penser que la surexpression de IGF-2 intervient très certainement tardivement dans le processus tumoral, donc plutôt au cours de la progression vers la forme maligne voire métastatique que dans l'initiation. *Ras* est muté dans 12,5% des ACS et CCS (Yashiro *et al.*, 1994), ce qui suggère que la mutation de cet oncogène est un événement précoce dans le processus de tumorigenèse, commun aux ACS et CCS.

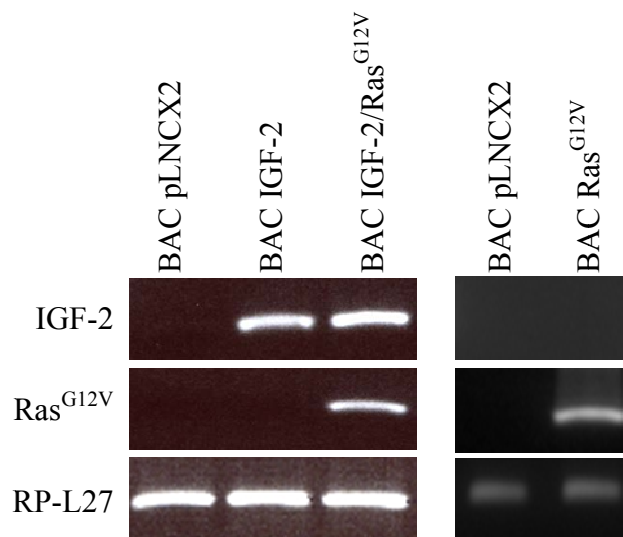
La surexpression de IGF-2 et Ras<sup>G12V</sup> permettait donc d'induire deux événements moléculaires dans des BAC primaires, l'un probablement impliqué dans l'initiation (mutation de Ras) et l'autre dans la progression tumorale (surexpression de IGF-2). La surexpression de ces deux gènes, seuls ou combinés, a été réalisée selon la méthode présentée dans la partie “Présentation des Résultats” (Figure 32 p98), en utilisant les vecteurs pLNCX2-IGF-2 et pBabe-Hygro-Ras<sup>G12V</sup>. Par simple ou double infection rétrovirale, trois populations polyclonales de BAC surexprimant IGF-2, Ras<sup>G12V</sup> ou IGF-2 et Ras<sup>G12V</sup> ont été générées.

La surexpression de IGF-2 et Ras<sup>G12V</sup> dans les trois types cellulaires produits a été vérifiée par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) semi-quantitative. Les amorces utilisées sont détaillées dans le Tableau 11 et les résultats de RT-PCR sont présentés en Figure 35.

Gène	Amorces		Tm (°C)	Nombre de cycles	Taille de l'amplicon (pb)
<i>IGF-2</i> (Humain)	Sens Antisens	ACACCCTCCAGTTCGTCTGT GGACTGCTTCCAGGTGTCAT	58	28	251
<i>Ras</i> <sup>G12V</sup> (Humain)	Sens Antisens	ATGACGGAATATAAGCTGGTGGT TCAGGAGAGCACACACTTGC	58	28	570
<i>RP-L27</i> (Bovin)	Sens Antisens	GCGGCTATCGTGAAGAACATTG CCTTGCGTTTGAGAGCAGGG	55	28	262

**Tableau 11 :** Amorces utilisées pour vérifier l'expression de l'ARNm de IGF-2 et *Ras*<sup>G12V</sup> dans les BAC transduites avec IGF-2, *Ras*<sup>G12V</sup> ou IGF-2 et *Ras*<sup>G12V</sup>.

D'après la Figure 35, il apparaît que IGF-2 est effectivement bien exprimé au niveau ARN messager dans les cellules ayant été infectées, alors qu'il n'est pas exprimé dans les BAC *Ras*<sup>G12V</sup> ou les BAC contrôles pLNCX2, simplement infectées avec le vecteur rétroviral pLNCX2 vide. De même, *Ras* est bien surexprimé dans les BAC *Ras*<sup>G12V</sup> et IGF-2/*Ras*<sup>G12V</sup> alors que l'ARNm endogène n'est pas détectable dans les cellules pLNCX2 et les cellules IGF-2.

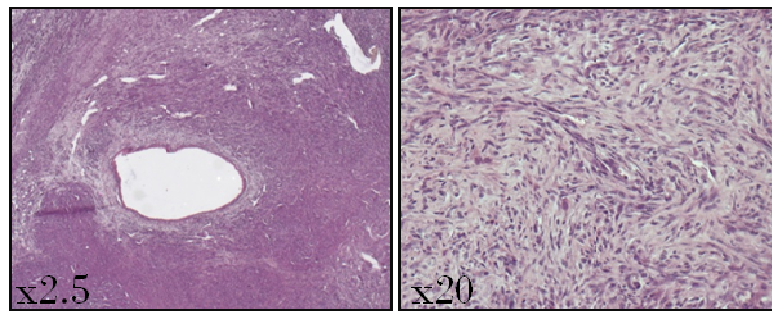


**Figure 35 :** Vérification par RT-PCR de la surexpression de IGF-2 et *Ras*<sup>G12V</sup> dans des BAC transduites avec IGF-2, *Ras*<sup>G12V</sup> ou IGF-2 et *Ras*<sup>G12V</sup>.

Les BAC pLNCX2 sont des BAC contrôles qui ont été transduites avec le vecteur pLNCX2 vide afin de s'assurer que le phénotype obtenu est bien lié à l'expression d'un ou plusieurs transgènes et n'est pas un artefact dû à la manipulation *in vitro* des cellules. RP-L27 (Ribosomal protein-L27) est un gène de ménage servant de contrôle de charge.

Les populations polyclonales de BAC, IGF-2, Ras<sup>G12V</sup> et IGF-2/Ras<sup>G12V</sup>, ont été transplantées sous la capsule rénale de souris Scid surrénalectomisées. Les résultats concernant la surexpression de Ras<sup>G12V</sup> seul ont été précédemment présentés dans l'Article. Nous rappelons que l'expression de cet oncogène a induit la formation d'une tumeur bénigne (Article, Figure 5 p153).

Sept animaux ont été transplantés avec les BAC IGF-2. Au moment du sacrifice, 35 jours après l'opération, l'ensemble des souris présentait des tumeurs rénales extrêmement agressives (Figure 36). Le rein hôte était entièrement détruit par la tumeur et les cellules bovines transplantées n'étaient alors plus détectables par des techniques d'IHC, utilisant un anticorps dirigé contre IGF-2 (clone S1F2 ; 1/400 ; Upstate).

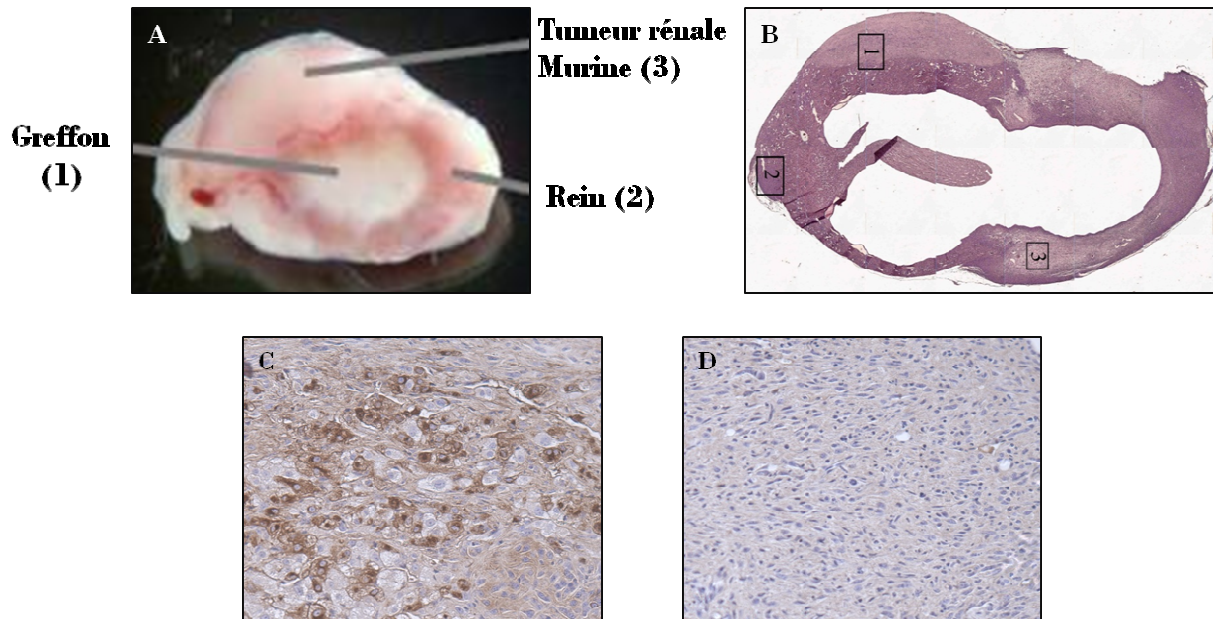


**Figure 36** : Coloration Hématoxyline & Éosine de tumeurs murines, 35 jours après la transplantation de BAC IGF-2.

---

Des BAC surexprimant IGF-2 avaient précédemment été générées au laboratoire et transplantées de la même manière, sous la capsule rénale de souris immunodéficientes surrénalectomisées. Les résultats avaient été très similaires puisqu'une tumeur murine détruisant le rein avait également été obtenue (Figures 37A et 37B). Toutefois, lors de ces expériences précédentes, une partie du rein et le greffon subsistaient (Figures 37A et 37B). Ce dernier était intact sur le rein transplanté et exprimait effectivement IGF-2 en IHC (Figure 37C).





**Figure 37 :** Tumeur murine induite par la transplantation des BAC surexprimant IGF-2.

A) Vue macroscopique d'un rein, 35 jours après transplantation de BAC IGF-2 ; B) Coloration Hématoxyline & Éosine d'une coupe d'un rein hôte, permettant de visualiser le greffon (1), la partie intact du rein (2) et la tumeur rénale murine (3) ; C) IHC IGF-2 au niveau d'un greffon IGF-2 (x20) ; D) IHC IGF-2 au niveau d'une tumeur rénale murine (x20).

Nous ne nous expliquons actuellement pas pourquoi le destin du greffon formé par les cellules transplantées varie d'une expérience à une autre, c'est-à-dire pourquoi il ne nous a pas été possible de retrouver les cellules bovines, alors que dans des expériences antérieures menées également au laboratoire, le greffon avait subsisté, à proximité d'une tumeur murine n'ayant pas totalement envahi le rein. Cependant, au vu de l'ensemble des résultats obtenus, il semblerait que la sécrétion de IGF-2 par les cellules bovines transplantées ait une action paracrine sur les cellules murines rénales, conduisant à leur hyperprolifération. Ces cellules, en elles-mêmes, ne surexpriment pas IGF-2 d'après l'absence de marquage de cette protéine dans la tumeur murine (Figure 37D).

En parallèle, les BAC surexprimant *IGF-2* et *Ras*<sup>G12V</sup>, produites par transduction simultanée des deux gènes (Figure 32 p109), ont été transplantées chez 6 animaux, dont 4 ont été euthanasiés à 15 jours et 2 à 21 jours post-opératoire. Ces animaux ont été sacrifiés précocement par rapport aux 35 jours habituels, car nous voulions avoir la possibilité d'observer le greffon avant que celui-ci ne soit détruit ou masqué par l'éventuelle tumeur murine induite par la surexpression de IGF-2 dans les cellules transplantées. Malheureusement, dès 15 jours, ces souris ont également développé des tumeurs rénales qui

ne permettaient plus d'identifier les cellules transplantées et donc d'étudier le phénotype induit par la surexpression de IGF-2 et l'activation constitutive des voies impliquant Ras (Figure 38).

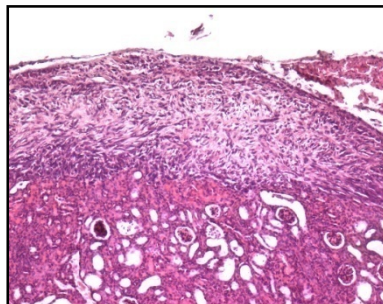


Figure 38 : Coloration Hématoxyline & Éosine d'une tumeur murine formée 15 jours après la transplantation de BAC IGF-2/Ras<sup>G12V</sup> (x10).

### 3.2 $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et p53<sup>DD</sup>

Le gène codant pour  $\beta$ -caténine a récemment été montré comme étant muté dans environ 30% des adénomes et des carcinomes (Tissier *et al.*, 2005), ce qui suggère que cette mutation pourrait être un événement précoce dans le processus de tumorigenèse corticosurrénalienne, événement commun aux ACS et CCS. Pour notre étude, nous avons choisi de surexprimer une forme mutée de  $\beta$ -caténine,  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, dans laquelle la sérine 37 est substituée par un résidu alanine. Lorsque la voie Wnt est inactive,  $\beta$ -caténine est dégradée par la voie ubiquitine-protéasome après avoir été phosphorylée sur le résidu sérine 45 par la kinase CK1, et sur les résidus thréonine 41, sérine 37 et sérine 33 par GSK-3 $\beta$  (Liu *et al.*, 2002). La substitution de la sérine 37 par un résidu alanine ne permet donc plus à GSK-3 $\beta$  de phosphoryler  $\beta$ -caténine et cette seule absence de phosphorylation ne permet plus à  $\beta$ -caténine de recruter  $\beta$ -TrCP pour induire sa dégradation.  $\beta$ -caténine s'accumule alors dans la cellule, et notamment au niveau nucléaire ; la voie Wnt est ainsi constitutivement activée et la transcription des gènes cibles, notamment de ceux impliqués dans la prolifération et la survie cellulaires, est anormalement induite.

Avant la mise en évidence de la mutation de  $\beta$ -caténine dans les TCS (30%) (Tissier *et al.*, 2005), la mutation de *TP53* était la mutation la plus fréquemment observée (25% des cas) (Ohgaki *et al.*, 1993 ; Reincke *et al.*, 1994 ; Barzon *et al.*, 2001a ; Sidhu *et al.*, 2005). Cependant, contrairement à  $\beta$ -caténine, *TP53* est muté presque uniquement dans les CCS et

très rarement dans les ACS (Ohgaki *et al.*, 1993 ; Reincke *et al.*, 1994 ; Barzon *et al.*, 2001a), ce qui suggère que la mutation de ce gène suppresseur de tumeurs serait un événement tardif, plutôt impliqué dans la progression tumorale corticosurrénalienne que dans l’initiation.

Comme dans le cas de la surexpression simultanée de IGF-2 et Ras<sup>G12V</sup>, la surexpression de p53<sup>DD</sup> et  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> dans des BAC primaires permettait donc d’observer le phénotype induit par deux altérations, l’une probablement impliquée dans l’initiation (mutation de  $\beta$ -caténine) et l’autre dans la progression tumorale (mutation de TP53).

$\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et p53<sup>DD</sup> ont été surexprimés individuellement ou ensemble, selon la méthode présentée dans la partie “Présentation des Résultats” (Figure 32 p109), en utilisant les vecteurs pLPCX- $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et pBabe-Hygro-p53<sup>DD</sup>. Par simple ou double infection rétrovirale, trois populations polyclonales de BAC surexprimant  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, p53<sup>DD</sup> ou  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et p53<sup>DD</sup> ont été générées.

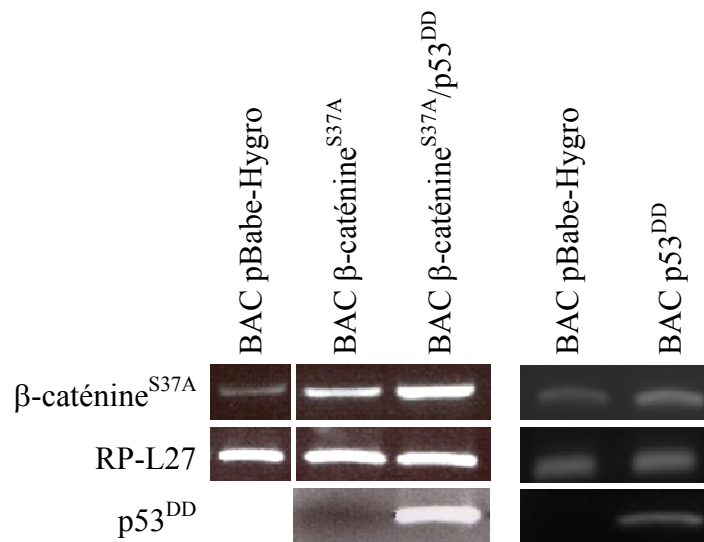
La surexpression de  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et p53<sup>DD</sup> dans ces trois populations polyclonales de BAC a été vérifiée par RT-PCR semi-quantitative en utilisant les amorces détaillées dans le Tableau 12. Les résultats sont présentés en Figure 39.

Gène	Amorces		Tm (°C)	Nombre de cycles	Taille de l’amplicon (pb)
$\beta$ -caténine <sup>S37A</sup> (Humain)	Sens	TGCCTTGCTCAACAAAACAA	55	28	793
	Antisens	GGTATCCTGATGTGCACGGA			
p53 <sup>DD</sup> (Murin)	Sens	AAAGGATGCCCATGCTACAG	58	28	231
	Antisens	TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA			
RP-L27 (Bovin)	Sens	GCGGCTATCGTGAAGAACATTG	55	28	262
	Antisens	CCTTGCGTTTGAGAGCAGGG			

Tableau 12 : Amorces utilisées pour vérifier l’expression de l’ARNm de  $\beta$ caténine<sup>S37A</sup> et p53<sup>DD</sup> dans les BAC transduites avec  $\beta$ caténine<sup>S37A</sup>, p53<sup>DD</sup> ou  $\beta$ caténine<sup>S37A</sup>.

D’après la Figure 39,  $\beta$ -caténine est exprimée dans les cellules contrôles, transduites avec le vecteur pBabe-Hygro vide, ainsi que dans les BAC transduites uniquement avec p53<sup>DD</sup>. Il s’agit du niveau endogène de l’ARNm du gène  $\beta$ -caténine bovin sauvage. Dans les cellules transduites avec  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, seule ou combiné à p53<sup>DD</sup>, le taux d’ARNm de  $\beta$ -caténine est

très fortement augmenté, ce qui traduit l'importante expression du transgène mutant. L'ARNm de p53<sup>DD</sup> est également bien exprimé dans les BAC p53<sup>DD</sup> et  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>/p53<sup>DD</sup>.



**Figure 39 :** Vérification par RT-PCR de la surexpression de  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et p53<sup>DD</sup> dans des BAC transduites avec  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, p53<sup>DD</sup> ou  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et p53<sup>DD</sup>.

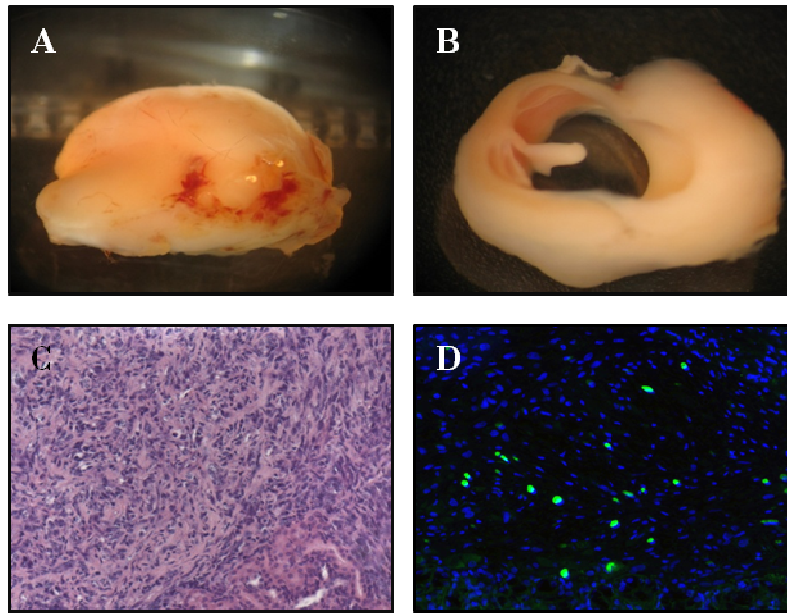
Les BAC pBabe-Hygro sont des BAC contrôles qui ont été transduites avec un vecteur vide afin de s'assurer que le phénotype obtenu est bien lié à l'expression d'un ou plusieurs transgènes et n'est pas un artéfact dû à la manipulation *in vitro* des cellules. RP-L27 est un gène de ménage servant de contrôle de charge.

La transplantation des BAC ne surexprimant que p53<sup>DD</sup> a conduit à la formation d'un tissu normal sur les plans fonctionnel et histologique. Ces résultats ont été présentés dans en Figure 5 (p153) de l'Article.

Lorsque les BAC  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> ont été transplantées, une masse a très rapidement été visible macroscopiquement sur les souris opérées, sous la peau du dos. Les 8 souris opérées ont ainsi été sacrifiées à 21 jours post-opératoire car il semblait très clair qu'une tumeur s'était formée et que celle-ci était déjà de taille très importante.

Au moment du sacrifice, des tumeurs très volumineuses étaient effectivement présentes et avaient complètement dégradé le rein hôte (Figures 40A et 40B). A l'étude histologique de ces tumeurs, il est cependant apparu que celles-ci étaient d'origine murine. Deux autres populations de BAC surexprimant  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> ont alors été générées et pour ces deux lignées, la transplantation a également conduit à la formation d'une tumeur murine. Les cellules transplantées étaient très difficiles à retrouver sur les coupes histologiques, au sein de la tumeur murine (Figure 40C). Toutefois, après de nombreuses coupes en série des tissus, quelques cellules bovines, dispersées dans la tumeur murine, ont pu être observées. En effet,

des marquages immunofluorescents de l'antigène Ki-67, avec l'anticorps MIB-1 (1/100 ; Dako) spécifique des cellules humaines ou bovines, ont permis de mettre en évidence des cellules en prolifération. Fait étonnant, très peu de groupes de cellules bovines étaient présents, éparpillés au sein de la tumeur, mais l'ensemble de ces groupes était très prolifératif (Figure 40D).

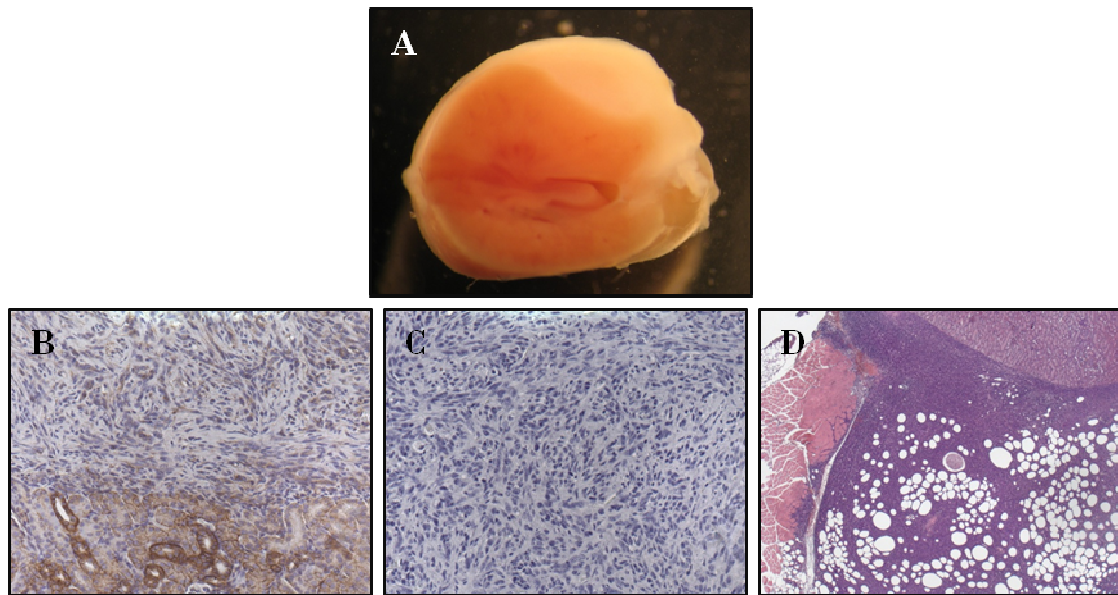


**Figure 40** : Tumeur murine induite par la transplantation de BAC surexprimant  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, à 21 jours post-opératoire.

A) Vue macroscopique d'un rein hôte ; B) Vue macroscopique d'un rein hôte coupé transversalement ; C) Coloration Hématoxyline & Éosine d'une coupe d'un rein tumoral (x10) ; D) Immunofluorescence Ki-67 (noyaux verts), contre-colorée au Dapi (noyaux bleus) (x20).

Il apparaissait donc que les cellules bovines avaient survécu à la transplantation et subsistaient au sein de la tumeur murine. Quatre autres animaux ont été opérés et sacrifiés 10 jours après l'opération afin de pouvoir observer le tissu corticosurrénalien surexprimant  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, avant que la tumeur murine ne devienne trop importante et ne masque le greffon.

A 10 jours post-opératoire, le tissu formé était déjà de taille importante, semblable à une hyperplasie (Figure 41A). Cependant, même à un temps aussi précoce, l'histologie du tissu après coloration Hématoxyline & Éosine a révélé une néoplasie d'origine murine et les cellules bovines étaient déjà très difficiles à repérer. Ceci a été confirmé par IHC en utilisant les anticorps dirigés contre  $\beta$ -caténine (clone 14 ; 1/400 ; BD Biosciences) et Ki-67 : aucun marquage n'était décelable dans la tumeur naissante (Figures 41B et 41C).



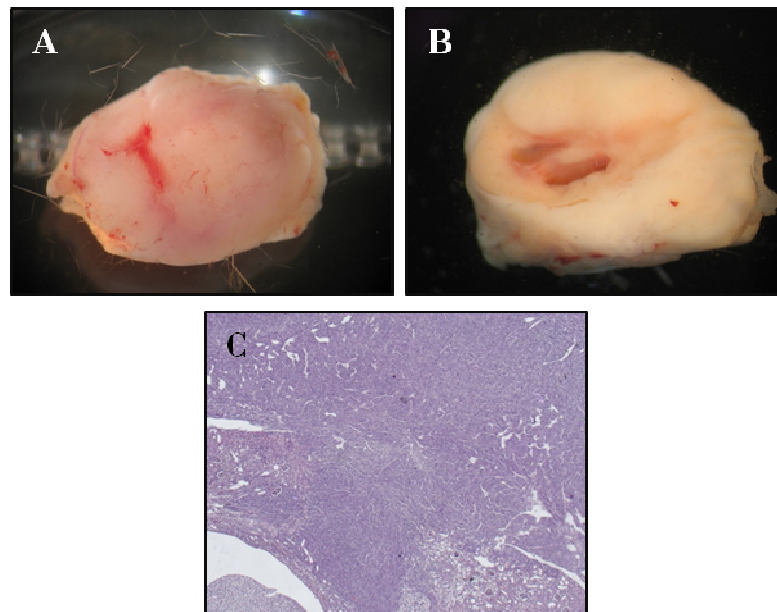
**Figure 41** : Hyperplasie induite par la transplantation de BAC surexprimant  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, à 10 jours post-opératoire.

A) Vue macroscopique d'un rein hôte coupé transversalement ; B) IHC  $\beta$ -caténine montrant la liaison rein/tissu. Le tissu n'est pas marqué, en revanche un marquage positif dans le rein montre l'expression endogène très forte de  $\beta$ -caténine au niveau des tubules rénaux (x20) ; C) IHC Ki-67 au niveau du tissu néoplasique (x20) ; D) Coloration Hématoxyline & Éosine au niveau des tissus adjacents, montrant la présence de cellules tumorales dans la graisse et le muscle (x2.5)

Chez certains de ces animaux euthanasiés à 10 jours, la tumeur envahissait également les tissus adjacents au rein transplanté, la graisse et le muscle (Figure 41D). La frontière entre cette tumeur et le parenchyme rénal était nette, sans signe apparent d'altérations histologiques (Figure 41D), ce qui laisse suggérer que la tumeur murine se développerait aux dépens des cellules fibroblastiques de la capsule rénale.

La transplantation des BAC surexprimant simultanément  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et p53<sup>DD</sup> a conduit aux mêmes résultats. En effet, à 21 jours post-opératoire, les 3 animaux opérés présentaient également une tumeur murine ne permettant pas d'observer le phénotype induit par l'altération simultanée des voies Wnt et p53 (Figure 42).

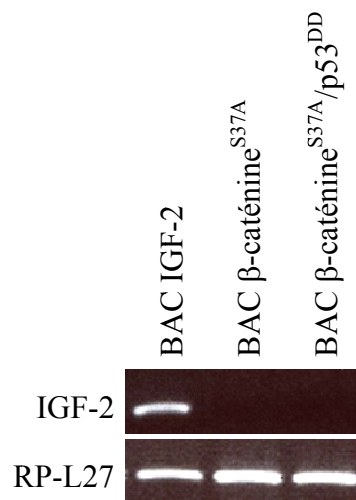




**Figure 42** : Tumeur murine induite par la transplantation de BAC surexprimant  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et p53<sup>DD</sup>, à 21 jours post-opératoire.

A) Vue macroscopique d'un rein hôte ; B) Vue macroscopique d'un rein tumoral coupé transversalement ; C) Coloration Hématoxyline & Éosine d'une coupe d'un rein tumoral (x2.5).

Au vu de ces résultats, très similaires à ceux obtenus avec IGF-2, nous avons pensé que l'activation constitutive de la voie Wnt induisait, dans les BAC surexprimant  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, la surexpression de IGF-2 car ce dernier est une cible transcriptionnelle de cette voie dans certain types cellulaires (Longo *et al.*, 2002). Cette hypothèse n'a cependant pas été confirmée puisque qu'aucune expression de l'ARNm de IGF-2 n'a été détectée dans des BAC  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>/p53<sup>DD</sup> (Figure 43).



**Figure 43** : Vérification par RT-PCR de l'induction de l'expression de IGF2 (cf. amorces dans le Tableau 11) dans les BAC  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>/p53<sup>DD</sup>.

### 3.3 Discussion

#### 3.3.1 Surexpression de IGF-2, seul ou associé à Ras<sup>G12V</sup>

La transplantation de cellules corticosurréaliennes bovines surexprimant IGF-2 a conduit à la formation d'une tumeur murine, détruisant le rein partiellement ou totalement, en fonction des expériences. Au niveau corticosurréalien, la surexpression de IGF-2 ne semble induire aucun phénotype particulier, puisque même lorsque le greffon n'était pas détruit par la tumeur rénale, celui-ci présentait toutes les caractéristiques histologiques d'un tissu normal. Ces expériences semblent donc confirmer l'hypothèse de l'intervention tardive de la surexpression de IGF-2 dans le processus de tumorigenèse corticosurréalienne.

En ce qui concerne la combinaison IGF-2/Ras<sup>G12V</sup>, il n'a pas été possible de conclure quant au phénotype corticosurréalien induit par ces deux altérations. En effet, à aucun moment il n'a été possible d'observer le greffon, même à 15 jours post-opératoire. Il a été montré, au travers de l'Article, que l'altération des voies impliquant Ras suffit à induire un tissu hyperplasique, capable de progresser en tumeur maligne suite à l'inactivation de la voie p53. En revanche, dans le cas de la combinaison IGF-2/Ras<sup>G12V</sup>, il semble très probable que la surexpression de IGF-2 n'ait pas permis la progression du phénotype bénin induit par Ras<sup>G12V</sup>, vers un phénotype malin. En effet, si tel avait été le cas, les cellules transplantées tumorales auraient eu un avantage prolifératif qui aurait très probablement permis de les identifier, sous forme de nodules tumoraux ou par groupes de cellules, mélangés aux cellules tumorales murines.

#### 3.3.2 Surexpression de $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, seule ou associée à p53<sup>DD</sup>

L'activation constitutive de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par transduction de  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, seule ou combinée à p53<sup>DD</sup> dans des BAC primaires a induit, après transplantation de ces cellules, un phénotype tumoral murin dont l'origine n'est pas claire : parenchyme rénal ou capsule rénale. Au sein de ces tumeurs, les cellules transplantées ont survécues puisque de petits groupes cellulaires très prolifératifs ont été mis en évidence par un immunomarquage du Ki-67.

Ces résultats n'ont pas permis pas de conclure que l'activation constitutive de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine suffit à induire une tumeur bénigne, comme cela a été montré dans l'Article pour l'activation des voies de signalisation impliquant Ras ; les mutations de Ras et  $\beta$ -caténine étant deux événements supposés comme étant initiateurs du processus tumoral. Les résultats



obtenus avec la combinaison  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>/p53<sup>DD</sup> n'ont pas non plus permis de conclure quant à l'effet de promotion tumorale induite par l'inactivation de la voie p53 lorsque la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est activée, comme nous l'avons montré pour la combinaison Ras<sup>G12V</sup>/p53<sup>DD</sup>, où l'inactivation de la fonction suppressive de tumeurs de p53 suffit à faire progresser la tumeur bénigne vers une tumeur maligne.

### 3.3.3 Conclusion

Que l'on surexprime IGF-2 ou que l'on active la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par surexpression de  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, le phénotype est très similaire. En effet, dans tous les cas, la transplantation des cellules, sous la capsule rénale, induit la formation de tumeurs murines extrêmement agressives, sans temps de latence puisque dès 10 jours post-opératoire, le tissu formé est déjà uniquement constitué de cellules murines. Au départ, nous ne connaissions pas le phénotype induit par la surexpression de  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et nous pensions donc que la tumeur murine du rein hôte ayant reçu les cellules IGF-2 était uniquement due à une action paracrine de ce facteur de croissance sur les cellules rénales.

Des résultats obtenus avec  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, nous avons émis l'hypothèse que, le phénotype induit par ce gène étant très similaire à celui induit par la surexpression de IGF-2, l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine devait provoquer la surexpression de IGF-2, d'autant plus que le gène codant pour ce facteur de croissance a été montré comme étant une cible transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF dans certains types cellulaires (Longo *et al.*, 2002). Cependant, par RT-PCR, aucune surexpression de IGF-2 n'a été retrouvée dans les BAC exprimant  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>. L'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine doit donc induire l'expression de facteurs de croissance autres que IGF-2, tels que des facteurs de la famille des FGF (Shimokawa *et al.*, 2003 ; Chamorro *et al.*, 2005 ; Hendrix *et al.*, 2006), et dont l'action paracrine sur le rein ou les tissus adjacents induirait une hyperprolifération de cellules sensibles à ces facteurs.

Bien que IGF-2 ne soit pas surexprimé dans les BAC  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, il n'est pas à exclure que les phénotypes induits par la transplantation de BAC surexprimant IGF-2 ou  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> n'aient pas la même origine. Ainsi, la tumeur murine formée suite à la transplantation des BAC IGF-2 pourrait ne pas être due à une action paracrine de IGF-2, mais à l'action d'un autre facteur de croissance (FGF par exemple) dont l'expression serait stimulée par une voie

Wnt/ $\beta$ -caténine anormalement activée. En effet, en 2001, Morali *et al.* ont montré, dans plusieurs lignées cellulaires épithéliales, que IGF1-R, récepteur de IGF-2, fait partie d'un complexe supramoléculaire incluant E-cadhérine, et  $\beta$ -caténine. Dans ces lignées épithéliales, IGF-2 induit l'internalisation du complexe IGF1-R/E-cadhérine/ $\beta$ -caténine, la séquestration et la dégradation cytoplasmique de E-cadhérine et la redistribution de  $\beta$ -caténine vers le noyau, et l'activation subséquente des gènes cibles du complexe  $\beta$ -caténine/TCF (Morali *et al.*, 2001).



## **DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**

---



La possibilité de récapituler la progression tumorale dans des modèles animaux représente un grand défi de la recherche sur le cancer. La disponibilité de souris immunodéficientes a ainsi permis d'étudier le comportement d'explants tumoraux humains ou de lignées cellulaires tumorales humaines une fois transplantés chez l'animal. Bien que la transplantation d'explants tumoraux permette le maintien des propriétés morphologiques et moléculaires de la tumeur originale, déterminer quels oncogènes et /ou gènes suppresseurs de tumeurs ont coopéré pour induire et faire progresser la tumeur est impossible. Il en est de même pour la transplantation de lignées cellulaires qui en plus posent le problème d'avoir été soumises à une pression de sélection *in vitro* qui modifie leur phénotype ; les cellules ne reflètent alors plus parfaitement la tumeur dont elles ont été dérivées.

Pour comprendre les étapes du développement tumoral, il semble donc plus approprié de modifier génétiquement des cellules pour ensuite observer le phénotype induit par une combinaison d'altérations moléculaires. De nombreux types cellulaires normaux ont ainsi été modifiés et plusieurs combinaisons de gènes de mammifères ont été définies comme étant nécessaires et suffisantes pour induire la transformation maligne (Lazarov *et al.*, 2002 ; Drayton *et al.*, 2003 ; Chudnovsky *et al.*, 2005 ; Goessel *et al.*, 2005 ; Kendall *et al.*, 2005). Afin d'observer le phénotype *in vivo* de ces cellules génétiquement modifiées, la plupart de ces études a utilisé l'injection ectopique sous-cutanée comme site de transplantation, technique rapide et simple à mettre en œuvre, et permettant un suivi aisé de l'évolution de la masse tumorale par mesure de cette dernière avec un pied à coulisse. Le taux de survie des cellules injectées en sous-cutanée est cependant faible et de ce fait, il existe une pression de sélection qui induit l'acquisition d'un phénotype particulier, différent de celui de la population générale initialement injectée, notamment une plus grande résistance à la mort cellulaire. De plus, pour les études utilisant la transplantation sous-cutanée, entre quatre et six altérations, en fonction du type cellulaire, sont nécessaires pour induire la transformation maligne (Drayton *et al.*, 2003 ; Chudnovsky *et al.*, 2005 ; Goessel *et al.*, 2005 ; Kendall *et al.*, 2005). En revanche, une étude sur la transformation de cellules du derme, a montré que deux altérations, Cdk4<sup>R24C</sup> et Ras<sup>G12V</sup>, suffisent à induire un phénotype malin lorsque ces cellules sont transplantées dans leur site orthotopique, en intradermique (Lazarov *et al.*, 2002). Il a de plus été montré que suivant le site de transplantation, sous-cutanée ou orthotopique (qui permet un très bon taux de survie des cellules), les tumeurs ont des comportements différents, notamment en ce qui concerne leur capacité à former des métastases ou leur réponse à des thérapies antitumorales (Eccles *et al.*, 1994).

La transplantation orthotopique de cellules corticosurréaliennes étant techniquement difficile, le modèle de Thomas *et al.* (1997), modèle de transplantation ectopique, représente un bon compromis entre la transplantation orthotopique et l'injection en sous-cutanée. En effet, dans ce modèle, le taux de survie des cellules corticosurréaliennes primaires injectées est très bon, et ces cellules permettent la reconstitution d'un tissu corticosurrénalien fonctionnel et vascularisé alors que, injectées en sous-cutanée, ces mêmes cellules ne survivent pas (Thomas *et al.*, 1997 ; Hornsby *et al.*, 1998).

En 2002, Thomas *et al.*, ont montré que l'introduction de la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (hTERT), de SV40-T et de la forme oncogénique Ras<sup>G12V</sup> suffit à induire la transformation complète de BAC qui, transplantées sous la capsule rénale de souris immunodéficientes Scid, forment ainsi des tumeurs malignes. Plus tard, toujours en utilisant ce modèle, il a été montré que la réintroduction d'une activité télomérase n'est pas absolument nécessaire à la transformation de cellules corticosurréaliennes humaines et bovines (Sun *et al.*, 2004) : Ras<sup>G12V</sup> et SV40-T sont suffisants. SV40-T est cependant une protéine virale qui, d'une part, n'intervient pas dans la tumorigenèse humaine et qui, d'autre part, se lie et par conséquent inactive une large série de protéines des cellules hôtes. Cet antigène se lie par exemple à p53 (Manfredi and Prives, 1994), Rb (Moran, 1993), à l'ADN polymérase  $\alpha$  (Smale and Tjian, 1986), à des cofacteurs de transcription (Avantaggiati *et al.*, 1996) ou encore à la cycline A (Adamczewski *et al.*, 1993). La plupart de ces molécules est connue pour réguler le cycle et la croissance cellulaires, et avoir un rôle dans la tumorigenèse humaine. De ce fait, les études de Thomas *et al.* (2002) et de Sun *et al.* (2004) ne montraient pas la participation directe de voies de signalisation précises dans le processus tumoral corticosurrénalien. Récemment, il a été montré que l'altération des deux gènes suppresseurs de tumeurs, *Rb* et *TP53*, permet de remplacer les fonctions de SV40-T dans des combinaisons géniques induisant la transformation de cellules humaines normales (Boehm *et al.*, 2005 ; Kendall *et al.*, 2005).

Au travers de cette étude, nous avons montré que l'activation constitutive des voies impliquant Ras, induite par la surexpression de l'oncogène Ras<sup>G12V</sup>, et l'inactivation de la voie p53, provoquée par l'expression du dominant négatif p53<sup>DD</sup>, coopèrent dans le processus tumoral corticosurrénalien. Dans ce modèle, l'inactivation de la voie p53 remplace donc efficacement les altérations induites par l'expression de SV40-T et l'altération de la voie Rb n'est pas nécessaire.

Comme montré par Sun *et al.* (2004), ces résultats confirment que la réintroduction de l'activité télomérase, via l'expression de hTERT, n'est pas indispensable à l'établissement d'un phénotype malin, comme de nombreuses équipes l'ont affirmé suite à leurs études de transformation de cellules primaires normales (Drayton *et al.*, 2003 ; Chudnovsky *et al.*, 2005 ; Kendall *et al.*, 2005). Ces équipes avançaient alors que l'immortalisation des cellules, induite par cette activité, était indispensable à l'expression du phénotype malin après transplantation de ces cellules *in vivo*. Cependant, ces mêmes études ont toujours utilisé la transplantation en sous-cutanée et il est donc probable que le phénotype du tissu obtenu aurait été différent s'ils avaient injecté leurs cellules dans un site plus propice à la survie cellulaire. Et, de ce fait, l'expression de hTERT ne serait probablement pas indispensable. L'activité télomérase est fréquemment réactivée dans les CCS (Kinoshita *et al.*, 1998 ; Bamberger *et al.*, 1999 ; Mannelli *et al.*, 2000 ; Sticchi *et al.*, 2006 ; Else *et al.*, 2008), et nous n'affirmons donc pas que dans les cellules malignes Ras<sup>G12V</sup>/p53<sup>DD</sup> (PR) ou Ras<sup>G12V</sup>+p53<sup>DD</sup> (R+P), il n'y ait pas eu tout de même une réactivation de hTERT induite par ces oncogènes. L'activité télomérase dans ces cellules tumorales est actuellement en cours d'étude au laboratoire.

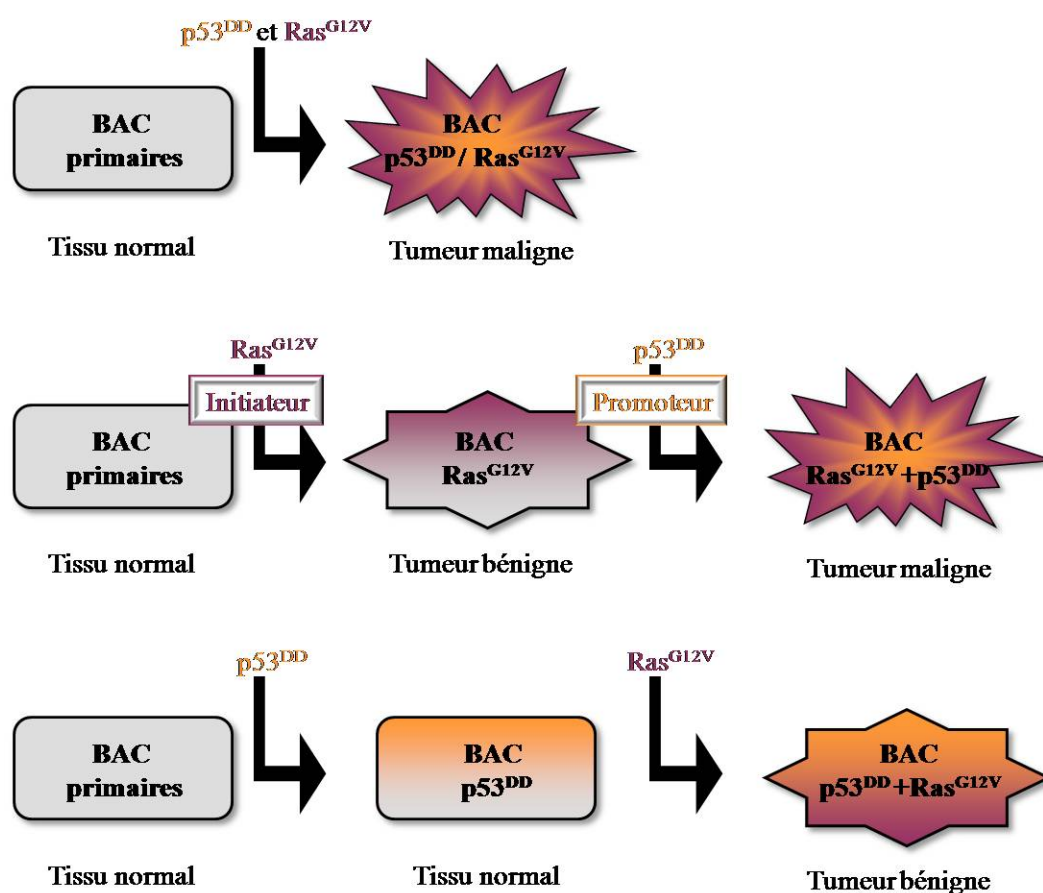
Une autre conclusion importante de ce travail est qu'il démontre pour la première fois que l'hypothèse de la progression tumorale multi-étapes peut également s'appliquer aux carcinomes corticosurrénaux. En effet, dans le modèle proposé, le tissu sain est progressivement transformé en tissu bénin puis en tissu malin suite à l'accumulation d'altérations génétiques, Ras<sup>G12V</sup> et p53<sup>DD</sup>. De plus, les voies Ras et p53 coopèrent selon une séquence précise, puisque si l'inactivation de la voie p53 permet de transformer la tumeur bénigne induite par l'activation des voies impliquant Ras, en tumeur maligne, l'inverse n'est pas vrai : l'inactivation de p53 en tant que premier événement, suivie de la surexpression de Ras<sup>G12V</sup>, induit seulement une tumeur bénigne (Figure 44). Cette tumeur formée par transplantation des BAC p53<sup>DD</sup>+Ras<sup>G12V</sup> (P+R) est très semblable à celle formée par les BAC qui surexpriment uniquement Ras<sup>G12V</sup> (R). Il n'est cependant pas possible de conclure que ces deux types cellulaires ont le même phénotype et il est probable que la présence de p53<sup>DD</sup> confère aux cellules P+R une plus grande susceptibilité à la transformation maligne que les cellules R.

Pour le moment, nous ne pouvons expliquer la différence de comportement entre les BAC P+R et R+P ; P+R induisant une tumeur bénigne et R+P une tumeur maligne très agressive. Nous pouvons toutefois émettre l'hypothèse que l'oncogène Ras<sup>G12V</sup> agirait en tant qu'initiateur du processus tumoral et p53<sup>DD</sup> en tant que promoteur (Figure 44). Le promoteur



ne pouvant agir sur des cellules non initiées, il serait ainsi normal que la simple expression de p53<sup>DD</sup> n'ait induit aucun phénotype. Pour les BAC PR, qui ont reçu simultanément l'initiateur et le promoteur, le phénotype tumoral s'explique peut-être par une sélection positive de cellules dans lesquelles Ras<sup>G12V</sup> aurait été introduit en premier au cours de l'infection. Mieux caractériser les voies de signalisation différenciellement activées dans les cellules PR, R+P et P+R, en aval de Ras et p53, permettrait certainement de mieux comprendre ces différences de phénotype.

En clinique humaine, l'hypothèse multi-étapes de la tumorigenèse corticosurrénalienne est très controversée et rien ne prouve encore que les tumeurs bénignes représentent une entité à part entière, ou s'il s'agit d'un néoplasme précédant un carcinome. Une étude a toutefois décrit une TCS présentant à la fois des nodules de cellules malignes et des nodules de cellules bénignes (Bernard *et al.*, 2003), ce qui est en faveur d'un processus multi-étapes. De plus, dans d'autres tissus, tels que le côlon, il est clairement établi que le développement des tumeurs malignes fait suite à une accumulation d'altérations génétiques induisant la progression des tumeurs bénignes vers des tumeurs malignes. Pourtant, dans le cas du côlon, même s'il est reconnu que les polypes adénomateux précèdent les carcinomes, la plupart d'entre eux ne progresseront jamais vers une tumeur maligne car les altérations génétiques supplémentaires, nécessaires à la progression tumorale, sont rares (Vogelstein and Kinzler, 1993). Il en est peut être de même pour le cortex surrénal ; une très petite partie des adénomes évoluerait en carcinomes, ce qui expliquerait la prévalence beaucoup plus importante des ACS, représentant plus de 70% des incidentalomes, par rapport aux CCS qui ne comptent que pour 4% (Mantero *et al.*, 2000).



**Figure 44 :** Schéma récapitulatif du processus multi-étapes de tumorigenèse corticosurrénalienne dans le modèle murin Ras<sup>G12V</sup> et p53<sup>DD</sup>.

Il n'a jamais été montré que les mutations de *Ras* et *TP53* sont présentes simultanément dans les CCS. Il serait donc intéressant de le vérifier. Cependant, s'il s'avère que ce n'est pas le cas, notre modèle n'en serait pas pour autant dépourvu de tout intérêt. En effet, la cascade Ras-Raf-MEK-ERK, est une voie effectrice, parmi d'autres, de l'activité de EGF-R (Grandis and Sok, 2004), récepteur surexprimé dans les 43% des ACS et presque 100% des CCS (Kamio *et al.*, 1990 ; Sasano *et al.*, 1994). EGF n'est pas surexprimé dans les carcinomes mais un autre ligand naturel de EGF-R, TGF $\alpha$ , l'est (Sasano *et al.*, 1994). TGF $\alpha$  est en outre une cible transcriptionnelle de la cascade Ras-Raf-MEK-ERK et de ce fait, il existe une boucle de régulation autocrine importante pour la transformation induite par Ras (Roberts and Der, 2007). L'activation constitutive de Ras, comme nous l'avons reproduit dans notre modèle, pourrait donc mimer la surexpression de EGF-R. Remplacer la surexpression de Ras<sup>G12V</sup> par la surexpression de EGF-R dans des BAC, permettrait de confirmer cette hypothèse. Ce travail n'a pas encore débuté au laboratoire. En revanche, nous avons déjà entrepris d'étudier l'importance des trois principales voies effectrices de Ras, RalGDS, Raf et PI3K dans le

processus tumoral induit par Ras<sup>G12V</sup> (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2005 ; Lim *et al.*, 2005 ; Lim and Counter, 2005) dans les cellules corticosurréaliennes. Pour cela, nous avons choisi de remplacer Ras<sup>G12V</sup> par trois autres mutants, Ras<sup>G12V/E37G</sup>, Ras<sup>G12V/T35S</sup> ou Ras<sup>G12V/Y40C</sup>, dans lesquels la deuxième mutation permet une activation constitutive d'une seule des trois voies, respectivement, RalGDS, Raf et PI3K (McFall *et al.*, 2001). Les expériences sont actuellement en cours. S'il apparaît que la voie Raf est principalement responsable du phénotype observé, ceci irait dans le sens de l'hypothèse que nous avons émise, à savoir que l'expression de Ras<sup>G12V</sup> mimerait la surexpression de EGF-R, puisque ce récepteur signale via la voie Raf-MEK-ERK (Grandis and Sok, 2004).

Le modèle que nous avons développé ne représente qu'un seul exemple de combinaison d'altérations et de nombreuses autres combinaisons, impliquant IGF-2, H19,  $\beta$ -caténine, p57<sup>Kip2</sup>, VEGF, ... doivent exister. Des combinaisons impliquant IGF-2 et  $\beta$ -caténine ont déjà été testées, mais ces études n'ont pas permis de conclure quant au phénotype corticosurrénalien du tissu formé suite à la transplantation de BAC surexprimant *IGF-2* et  *$\beta$ -caténine*<sup>S37A</sup>. Les études impliquant ces deux gènes nécessitent d'être largement approfondies. Il serait ainsi tout d'abord indispensable d'étudier plus avant le phénotype de ces cellules *in vitro*, notamment leur capacité de prolifération et leur comportement dans un test de transformation en milieu gélosé semi-liquide, ce qui permettrait d'avoir une première indication sur leur phénotype, normal, bénin ou malin. Il faudrait également être capable de déterminer les facteurs de croissance induits dans les cellules surexprimant  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup> et étudier la voie Wnt dans les BAC IGF-2 (Morali *et al.*, 2001). Enfin, l'observation *in vivo* du phénotype induit par l'expression de IGF-2, seul ou associé à Ras<sup>G12V</sup> et de  $\beta$ -caténine<sup>S37A</sup>, seule ou associée à p53<sup>DD</sup>, nécessiterait la transplantation des cellules dans un site autre que le rein, moins sensible à l'action paracrine de IGF-2 ou de tout autre facteur de croissance sécrété par ces cellules. Il serait ainsi envisageable de transplanter les cellules en sous-cutanée. Cependant, la transplantation par simple injection de cellules permettant aux seules cellules malignes de survivre et d'exprimer leur phénotype, il serait nécessaire de transplanter ces cellules dans une matrice de collagène (Popnikolov and Hornsby, 1999) qui permet l'expression de phénotypes normaux ou bénins.

Si l'on admet que la formation d'un carcinome est la résultante d'un processus multi-étapes et qu'une tumeur bénigne est donc une lésion néoplasique précédant le carcinome, il n'est probablement pas correct de penser que seules les anomalies génétiques présentes à la fois dans les TCS bénignes et les CCS sont les événements initiateurs du processus tumoral. En effet, en raison d'une instabilité génomique très importante dans les carcinomes, des gènes surexprimés ou éteints dans les adénomes - peut-être à l'origine de ces tumeurs bénignes - peuvent avoir retrouvé une expression normale dans les CCS, le maintien du phénotype tumoral étant alors assuré par des anomalies survenues plus tardivement (Weinstein, 2002 ; Felsher, 2008). De ce fait, se baser uniquement sur les études de puces à ADN (Giordano *et al.*, 2003 ; de Fraipont *et al.*, 2005 ; Velazquez-Fernandez *et al.*, 2005 ; Slater *et al.*, 2006), qui ne représentent qu'un instantané des tumeurs, malignes et bénignes, est insuffisant pour définir les altérations impliquées dans les premières étapes du développement tumoral.

En utilisant le modèle proposé dans cette étude, comparer les profils d'expression de la tumeur bénigne Ras<sup>G12V</sup> et de la tumeur maligne Ras<sup>G12V</sup>/p53<sup>DD</sup>, pourrait justement permettre d'identifier les voies de signalisation réellement impliquées dans l'initiation mais pas indispensables à l'évolution vers le carcinome, et celles propres à la progression. L'identification de ces voies, par des études de puces à ADN<sup>12</sup>, et la confirmation subséquente de leur implication dans l'initiation en utilisant toujours le modèle de Thomas *et al.* (1997), pourrait ainsi constituer un outil intéressant pour définir des cibles thérapeutiques spécifiques et donc développer de nouvelles options thérapeutiques, alternatives du Mitotane<sup>®</sup>, seul traitement existant à l'heure actuelle et malheureusement très peu efficace sur des tumeurs à des stades avancés (Kirschner, 2006).

<sup>12</sup><http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/bovine.affx>



## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



- Abdulkadir SA, Qu Z, Garabedian E, Song SK, Peters TJ, Svaren J, Carbone JM, Naughton CK, Catalona WJ *et al.* (2001). "Impaired prostate tumorigenesis in Egr1-deficient mice". *Nat Med*, 7(1): 101-107.
- Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R and Hoschuetzky H. (1994). "Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins". *Journal of cell science*, 107(12): 3655-3663.
- Aberle H, Schwartz H, Hoschuetzky H and Kemler R. (1996). "Single amino acid substitutions in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to alpha-catenin". *J Biol Chem*, 271(3): 1520-1526.
- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A and Kemler R. (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway". *The EMBO journal*, 16(13): 3797-3804.
- Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X and Bertherat J. (2006). "Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients". *J Clin Endocrinol Metab*, 91(7): 2650-2655.
- Adamczewski JP, Gannon JV and Hunt T. (1993). "Simian virus 40 large T antigen associates with cyclin A and p33cdk2". *Journal of virology*, 67(11): 6551-6557.
- Adamson ED and Mercola D. (2002). "Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival". *Tumour Biol*, 23(2): 93-102.
- Ahlman H, Khorram-Manesh A, Jansson S, Wangberg B, Nilsson O, Jacobsson CE and Lindstedt S. (2001). "Cytotoxic treatment of adrenocortical carcinoma". *World journal of surgery*, 25(7): 927-933.
- Aldred MA, Huang Y, Liyanarachchi S, Pellegata NS, Gimm O, Jhiang S, Davuluri RV, de la Chapelle A and Eng C. (2004). "Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes". *J Clin Oncol*, 22(17): 3531-3539.
- Allolio B and Fassnacht M. (2006). "Adrenocortical Carcinoma: Clinical Update". *J Clin Endocrinol Metab*, 91(6): 2027-2037.
- Aloni-Grinstein R, Schwartz D and Rotter V. (1995). "Accumulation of wild-type p53 protein upon gamma-irradiation induces a G2 arrest-dependent immunoglobulin kappa light chain gene expression". *The EMBO journal*, 14(7): 1392-1401.
- Amati F, Condo I, Conti E, Sangiuolo F, Dallapiccola B, Testi R and Novelli G. (2003). "Analysis of intracellular distribution and apoptosis involvement of the Ufd1l gene product by over-expression studies". *Cell biochemistry and function*, 21(3): 263-267.
- Anonymous. (1998). "beta-catenin links the APC gene to MYC in colon cancer". *Gastroenterology*, 115(5): 1041C-1042.
- Aristarkhov A, Eytan E, Moghe A, Admon A, Hershko A and Ruderman JV. (1996). "E2-C, a cyclin-selective ubiquitin carrier protein required for the destruction of mitotic cyclins". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9): 4294-4299.
- Armitage P and Doll R. (1954). "The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis". *British journal of cancer*, 8(1): 1-12.
- Arnaldi G, Freddi S, Mancini T, Kola B and Mantero F. (2000). "Transforming growth factor beta1: implications in adrenocortical tumorigenesis". *Endocr Res*, 26(4): 905-910.
- Arney KL. (2003). "H19 and Igf2--enhancing the confusion?" *Trends Genet*, 19(1): 17-23.
- Assie G, Antoni G, Tissier F, Caillou B, Abiven G, Gicquel C, Leboulleux S, Travagli JP, Dromain C *et al.* (2007). "Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma". *J Clin Endocrinol Metab*, 92(1): 148-154.
- Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, Wemeau JL, Lecomte-Houcke M and Leteurtre E. (2002). "Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors". *Am J Surg Pathol*, 26(12): 1612-1619.
- Avantaggiati ML, Carbone M, Graessmann A, Nakatani Y, Howard B and Levine AS. (1996). "The SV40 large T antigen and adenovirus E1a oncoproteins interact with distinct isoforms of the transcriptional co-activator, p300". *The EMBO journal*, 15(9): 2236-2248.



- Bader AG, Kang S, Zhao L and Vogt PK. (2005). "Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation". *Nat Rev Cancer*, 5(12): 921-929.
- Bai Y, Edamatsu H, Maeda S, Saito H, Suzuki N, Satoh T and Kataoka T. (2004). "Crucial role of phospholipase Cepsilon in chemical carcinogen-induced skin tumor development". *Cancer research*, 64(24): 8808-8810.
- Bamberger CM, Else T, Bamberger AM, Frilling A, Beil FU, Allolio B and Schulte HM. (1999). "Telomerase activity in benign and malignant adrenal tumors". *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 107(4): 272-275.
- Baptiste N, Friedlander P, Chen X and Prives C. (2002). "The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells". *Oncogene*, 21(1): 9-21.
- Barbosa AS, Giacaglia LR, Martin RM, Mendonca BB and Lin CJ. (2004). "Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms". *BMC endocrine disorders*, 4(1): 3.
- Barnett CC, Jr., Varma DG, El-Naggar AK, Dackiw AP, Porter GA, Pearson AS, Kudelka AP, Gagel RF, Evans DB *et al.* (2000). "Limitations of size as a criterion in the evaluation of adrenal tumors". *Surgery*, 128(6): 973-982;discussion 982-973.
- Barzilay JI and Pazianos AG. (1989). "Adrenocortical carcinoma". *Urol Clin North Am*, 16(3): 457-468.
- Barzon L, Chilosi M, Fallo F, Martignoni G, Montagna L, Palu G and Boscaro M. (2001a). "Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors". *Eur J Endocrinol*, 145(2): 207-212.
- Barzon L, Pasquali C, Grigoletto C, Pedrazzoli S, Boscaro M and Fallo F. (2001b). "Multiple endocrine neoplasia type 1 and adrenal lesions". *J Urol*, 166(1): 24-27.
- Baserga R, Peruzzi F and Reiss K. (2003). "The IGF-1 receptor in cancer biology". *Int J Cancer*, 107(6): 873-877.
- Bassett MH, Mayhew B, Rehman K, White PC, Mantero F, Arnaldi G, Stewart PM, Bujalska I and Rainey WE. (2005). "Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease". *J Clin Endocrinol Metab*, 90(9): 5446-5455.
- Beckers A, Abs R, Willems PJ, van der Auwera B, Kovacs K, Reznik M and Stevenaert A. (1992). "Aldosterone-secreting adrenal adenoma as part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): loss of heterozygosity for polymorphic chromosome 11 deoxyribonucleic acid markers, including the MEN1 locus". *J Clin Endocrinol Metab*, 75(2): 564-570.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R and Birchmeier W. (1996). "Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1". *Nature*, 382(6592): 638-642.
- Bergental DM, Hertz R and Lipsett MB. (1960). "Chemotherapy of advanced adrenocortical cancer with o'p'DDD". *Ann Intern Med*, 53: 672-82.
- Bernard MH, Sidhu S, Berger N, Peix JL, Marsh DJ, Robinson BG, Gaston V, Le Bouc Y and Gicquel C. (2003). "A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis". *J Clin Endocrinol Metab*, 88(3): 998-1001.
- Bernini GP, Moretti A, Bonadio AG, Menicagli M, Viacava P, Naccarato AG, Iacconi P, Miccoli P and Salvetti A. (2002). "Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex". *J Clin Endocrinol Metab*, 87(11): 4961-4965.
- Bertherat J. (2001). "Protein kinase A in Carney complex: a new example of cAMP pathway alteration in endocrine tumors". *Eur J Endocrinol*, 144(3): 209-211.
- Bertherat J, Mosnier-Pudar H and Bertagna X. (2002). "Adrenal incidentalomas". *Curr Opin Oncol*, 14(1): 58-63.
- Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, Papageorgiou T, Bourdeau I, Kirschner LS *et al.* (2003). "Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity". *Cancer research*, 63(17): 5308-5319.

- Bertherat J and Gimenez-Roqueplo AP. (2005). "New insights in the genetics of adrenocortical tumors, pheochromocytomas and paragangliomas". *Hormone and metabolic research. Hormon- und Stoffwechselforschung*, 37(6): 384-390.
- Beuschlein F, Reincke M, Karl M, Travis WD, Jaursch-Hancke C, Abdelhamid S, Chrousos GP and Allolio B. (1994). "Clonal composition of human adrenocortical neoplasms". *Cancer research*, 54(18): 4927-4932.
- Beuschlein F, Looyenga BD, Bleasdale SE, Mutch C, Bavers DL, Parlow AF, Nilson JH and Hammer GD. (2003). "Activin induces x-zone apoptosis that inhibits luteinizing hormone-dependent adrenocortical tumor formation in inhibin-deficient mice". *Mol Cell Biol*, 23(11): 3951-3964.
- Beuschlein F, Looyenga BD, Reincke M and Hammer GD. (2004). "Role of the inhibin/activin system and luteinizing hormone in adrenocortical tumorigenesis". *Hormone and metabolic research. Hormon- und Stoffwechselforschung*, 36(6): 392-396.
- Bielinska M, Parviainen H, Porter-Tinge SB, Kiiveri S, Genova E, Rahman N, Huhtaniemi IT, Muglia LJ, Heikinheimo M *et al.* (2003). "Mouse strain susceptibility to gonadectomy-induced adrenocortical tumor formation correlates with the expression of GATA-4 and luteinizing hormone receptor". *Endocrinology*, 144(9): 4123-4133.
- Bielinska M, Genova E, Boime I, Parviainen H, Kiiveri S, Leppaluoto J, Rahman N, Heikinheimo M and Wilson DB. (2005). "Gonadotropin-induced adrenocortical neoplasia in NU/J nude mice". *Endocrinology*, 146(9): 3975-3984.
- Bielinska M, Kiiveri S, Parviainen H, Mannisto S, Heikinheimo M and Wilson DB. (2006). "Gonadectomy-induced adrenocortical neoplasia in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*) and laboratory mouse". *Veterinary pathology*, 43(2): 97-117.
- Bienz M. (2005). "beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling". *Curr Biol*, 15(2): R64-67.
- Blagosklonny MV. (2000). "p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect". *FASEB J*, 14(13): 1901-1907.
- Blaker H, Sutter C, Kadmon M, Otto HF, Von Knebel-Doeberitz M, Gebert J and Helmke BM. (2004). "Analysis of somatic APC mutations in rare extracolonic tumors of patients with familial adenomatous polyposis coli". *Genes, chromosomes & cancer*, 41(2): 93-98.
- Boccuzzi A, Terzolo M, Cappia S, De Giuli P, De Risi C, Leonardo E, Bovio S, Borriero M, Paccotti P *et al.* (1999). "Different immunohistochemical patterns of TGF-beta1 expression in benign and malignant adrenocortical tumours". *Clin Endocrinol (Oxf)*, 50(6): 801-808.
- Boehm JS, Hession MT, Bulmer SE and Hahn WC. (2005). "Transformation of human and murine fibroblasts without viral oncoproteins". *Mol Cell Biol*, 25(15): 6464-6474.
- Boguski MS and McCormick F. (1993). "Proteins regulating Ras and its relatives". *Nature*, 366(6456): 643-654.
- Bonacci R, Gigliotti A, Baudin E, Wion-Barbot N, Emy P, Bonnay M, Cailleux AF, Nakib I and Schlumberger M. (1998). "Cytotoxic therapy with etoposide and cisplatin in advanced adrenocortical carcinoma". *British journal of cancer*, 78(4): 546-549.
- Bossis I and Stratakis CA. (2004). "Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions". *Endocrinology*, 145(12): 5452-5458.
- Boston BA, Mandel S, LaFranchi S and Bliziotis M. (1994). "Activating mutation in the stimulatory guanine nucleotide-binding protein in an infant with Cushing's syndrome and nodular adrenal hyperplasia". *J Clin Endocrinol Metab*, 79(3): 890-893.
- Boulle N, Logié A, Gicquel C, Perin L and Le Bouc Y. (1998). "Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors". *J Clin Endocrinol Metab*, 83(5): 1713-1720.
- Boulle N, Gicquel C, Logié A, Christol R, Feige JJ and Le Bouc Y. (2000). "Fibroblast growth factor-2 inhibits the maturation of pro-insulin-like growth factor-II (Pro-IGF-II) and the expression of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in the human adrenocortical tumor cell line NCI-H295R". *Endocrinology*, 141(9): 3127-3136.

- Boulle N, Baudin E, Gicquel C, Logié A, Bertherat J, Penfornis A, Bertagna X, Luton JP, Schlumberger M *et al.* (2001). "Evaluation of plasma insulin-like growth factor binding protein-2 as a marker for adrenocortical tumors". *Eur J Endocrinol*, 144(1): 29-36.
- Bourcigaux N, Gaston V, Logié A, Bertagna X, Le Bouc Y and Gicquel C. (2000). "High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors". *J Clin Endocrinol Metab*, 85(1): 322-330.
- Bourdeau I, Antonini SR, Lacroix A, Kirschner LS, Matyakhina L, Lorang D, Libutti SK and Stratakis CA. (2004). "Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators". *Oncogene*, 23(8): 1575-1585.
- Bourne HR, Sanders DA and McCormick F. (1990). "The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions". *Nature*, 348(6297): 125-132.
- Bourne HR, Sanders DA and McCormick F. (1991). "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism". *Nature*, 349(6305): 117-127.
- Brand C, Cherradi N, Defaye G, Chinn A, Chambaz EM, Feige JJ and Bailly S. (1998). "Transforming growth factor beta1 decreases cholesterol supply to mitochondria via repression of steroidogenic acute regulatory protein expression". *J Biol Chem*, 273(11): 6410-6416.
- Brauchle M, Gluck D, Di Padova F, Han J and Gram H. (2000). "Independent role of p38 and ERK1/2 mitogen-activated kinases in the upregulation of matrix metalloproteinase-1". *Exp Cell Res*, 258(1): 135-144.
- Brinckerhoff CE, Rutter JL and Benbow U. (2000). "Interstitial collagenases as markers of tumor progression". *Clin Cancer Res*, 6(12): 4823-4830.
- Bugalho MJ, Li X, Rao CV, Soares J and Sobrinho LG. (2000). "Presence of a Gs alpha mutation in an adrenal tumor expressing LH/hCG receptors and clinically associated with Cushing's syndrome". *Gynecol Endocrinol*, 14(1): 50-54.
- Bullock AN and Fersht AR. (2001). "Rescuing the function of mutant p53". *Nat Rev Cancer*, 1(1): 68-76.
- Burkitt HG, Young B and Heath JW. (1993). "Les glandes endocrines". *Histologie fonctionnelle. Wheather*, 3<sup>ème</sup> éd. Paris, Arnette-Blackwell, 304-322.
- Burns J, Barton C, Wynford-Thomas D and Lemoine N. (1993). "In vitro transformation of epithelial cells by ras oncogenes". *Epithelial cell biology*, 2(1): 26-43.
- Campisi J. (2001). "Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism". *Trends Cell Biol*, 11(11): S27-31.
- Campisi J, Kim SH, Lim CS and Rubio M. (2001). "Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection". *Experimental gerontology*, 36(10): 1619-1637.
- Candau R, Scolnick DM, Darpino P, Ying CY, Halazonetis TD and Berger SL. (1997). "Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity". *Oncogene*, 15(7): 807-816.
- Carney JA, Gordon H, Carpenter PC, Shenoy BV and Go VL. (1985). "The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity". *Medicine*, 64(4): 270-283.
- Carney JA. (1997). "Adrenal gland". In : SS Sternberg. *Histology for pathologists*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1107-1131.
- Chamorro MN, Schwartz DR, Vonica A, Brivanlou AH, Cho KR and Varmus HE. (2005). "FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development". *The EMBO journal*, 24(1): 73-84.
- Chao W and D'Amore PA. (2008). "IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease". *Cytokine & growth factor reviews*, 19(2): 111-120.
- Charmandari E, Brook CG and Hindmarsh PC. (2004). "Classic congenital adrenal hyperplasia and puberty". *Eur J Endocrinol*, 151 Suppl 3(U77-82).
- Chen DY, Sosa RE and Scherr DS. (2004). "Treatment of adrenocortical carcinoma: contemporary outcomes". *Current urology reports*, 5(1): 65-72.

- Chen X, Ko LJ, Jayaraman L and Prives C. (1996). "p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells". *Genes Dev*, 10(19): 2438-2451.
- Chidiac RM and Aron DC. (1997). "Incidentalomas. A disease of modern technology". *Endocrinol Metab Clin North Am*, 26(1): 233-253.
- Cho KR and Vogelstein B. (1992). "Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence". *Cancer*, 70(6 Suppl): 1727-1731.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD and Pavletich NP. (1994). "Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations". *Science*, 265(5170): 346-355.
- Chudnovsky Y, Adams AE, Robbins PB, Lin Q and Khavari PA. (2005). "Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations". *Nat Genet*, 37(7): 745-749.
- Clark AJ, Baig AH, Noon L, Swords FM, Hunyady L and King PJ. (2003). "Expression, desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R)". *Ann N Y Acad Sci*, 994(111-117).
- Clark BJ and Stocco DM. (1997). "Steroidogenic acute regulatory protein: the StAR still shines brightly". *Mol Cell Endocrinol*, 134(1): 1-8.
- Clemmons DR. (1997). "Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions". *Cytokine & growth factor reviews*, 8(1): 45-62.
- Clevers H and van de Wetering M. (1997). "TCF/LEF factor earn their wings". *Trends Genet*, 13(12): 485-489.
- Constancia M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A *et al.* (2002). "Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth". *Nature*, 417(6892): 945-948.
- Copeland PM. (1983). "The incidentally discovered adrenal mass". *Ann Intern Med*, 98(6): 940-945.
- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P and Matrisian LM. (1999). "The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors". *Oncogene*, 18(18): 2883-2891.
- Cullen PJ. (2001). "Ras effectors: buying shares in Ras plc". *Curr Biol*, 11(9): R342-344.
- Cully M, You H, Levine AJ and Mak TW. (2006). "Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis". *Nat Rev Cancer*, 6(3): 184-192.
- Dackiw AP, Lee JE, Gagel RF and Evans DB. (2001). "Adrenal cortical carcinoma". *World journal of surgery*, 25(7): 914-926.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y and Greenberg ME. (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery". *Cell*, 91(2): 231-241.
- Davies E, Bonnardeaux A, Plouin PF, Corvol P and Clauser E. (1997). "Somatic mutations of the angiotensin II (AT1) receptor gene are not present in aldosterone-producing adenoma". *J Clin Endocrinol Metab*, 82(2): 611-615.
- de Fraipont F, El Atifi M, Gicquel C, Bertagna X, Chambaz EM and Feige JJ. (2000). "Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations". *J Clin Endocrinol Metab*, 85(12): 4734-4741.
- de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, Bertherat J, Bertagna X, Plouin PF *et al.* (2005). "Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy". *J Clin Endocrinol Metab*, 90(3): 1819-1829.
- Deal C, Ma J, Wilkin F, Paquette J, Rozen F, Ge B, Hudson T, Stampfer M and Pollak M. (2001). "Novel promoter polymorphism in insulin-like growth factor-binding protein-3: correlation with serum levels and interaction with known regulators". *J Clin Endocrinol Metab*, 86(3): 1274-1280.
- DeChiara TM, Robertson EJ and Efstratiadis A. (1991). "Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene". *Cell*, 64(4): 849-859.

- Decker RA, Elson P, Hogan TF, Citrin DL, Westring DW, Banerjee TK, Gilchrist KW and Horton J. (1991). "Eastern Cooperative Oncology Group study 1879: mitotane and adriamycin in patients with advanced adrenocortical carcinoma". *Surgery*, 110(6): 1006-1013.
- Demeure MJ and Somberg LB. (1998). "Functioning and nonfunctioning adrenocortical carcinoma: clinical presentation and therapeutic strategies". *Surg Oncol Clin N Am*, 7(4): 791-805.
- Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC and Forbes BE. (2005). "Molecular interactions of the IGF system". *Cytokine & growth factor reviews*, 16(4-5): 421-439.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O and Kolch W. (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer". *Oncogene*, 26(22): 3279-3290.
- Diaz-Cano SJ, de Miguel M, Blanes A, Tashjian R, Galera H and Wolfe HJ. (2000). "Clonality as expression of distinctive cell kinetics patterns in nodular hyperplasias and adenomas of the adrenal cortex". *Am J Pathol*, 156(1): 311-319.
- DiBartolomeis MJ and Jefcoate CR. (1984). "Characterization of the acute stimulation of steroidogenesis in primary bovine adrenal cortical cell cultures". *J Biol Chem*, 259(16): 10159-10167.
- Didolkar MS, Bescher RA, Elias EG and Moore RH. (1981). "Natural history of adrenal cortical carcinoma: a clinicopathologic study of 42 patients". *Cancer*, 47(9): 2153-2161.
- Dobson H and Kanchev LN. (1977). "Effect of adrenal stimulation on bovine plasma steroids". *Journal of reproduction and fertility*, 50(2): 357-358.
- Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S and Lichter P. (2000). "Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications". *Genes, chromosomes & cancer*, 28(2): 145-152.
- Donovan S, Shannon KM and Bollag G. (2002). "GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling". *Biochim Biophys Acta*, 1602(1): 23-45.
- Dornan D, Shimizu H, Burch L, Smith AJ and Hupp TR. (2003). "The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53". *Mol Cell Biol*, 23(23): 8846-8861.
- Downward J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy". *Nat Rev Cancer*, 3(1): 11-22.
- Drayton S, Rowe J, Jones R, Vatcheva R, Cuthbert-Heavens D, Marshall J, Fried M and Peters G. (2003). "Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes". *Cancer cell*, 4(4): 301-310.
- Duperray A and Chambaz EM. (1980). "Effect of prostaglandin E1 and ACTH on proliferation and steroidogenic activity of bovine adreno-cortical cells in primary culture". *Journal of steroid biochemistry*, 13(11): 1359-1364.
- Eccles SA, Box G, Court W, Sandle J and Dean CJ. (1994). "Preclinical models for the evaluation of targeted therapies of metastatic disease". *Cell Biophys*, 24-25(279-291).
- Edgren M, Eriksson B, Wilander E, Westlin JE, Nilsson S and Oberg K. (1997). "Biological characteristics of adrenocortical carcinoma: a study of p53, IGF, EGF-r, Ki-67 and PCNA in 17 adrenocortical carcinomas". *Anticancer Res*, 17(2B): 1303-1309.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW *et al.* (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression". *Cell*, 75(4): 817-825.
- Else T, Giordano TJ and Hammer GD. (2008). "Evaluation of telomere length maintenance mechanisms in adrenocortical carcinoma". *J Clin Endocrinol Metab*, 93(4): 1442-1449.
- Feige JJ and Baird A. (1991). "Growth factor regulation of adrenal cortex growth and function". *Progress in growth factor research*, 3(2): 103-113.
- Feige JJ, Cochet C, Savona C, Shi DL, Keramidas M, Defaye G and Chambaz EM. (1991). "Transforming growth factor beta 1: an autocrine regulator of adrenocortical steroidogenesis". *Endocr Res*, 17(1-2): 267-279.
- Feige JJ, Vilgrain I, Brand C, Bailly S and Souchelnitskiy S. (1998). "Fine tuning of adrenocortical functions by locally produced growth factors". *J Endocrinol*, 158(1): 7-19.

- Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G and Semenza GL. (1999). "Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2". *Cancer research*, 59(16): 3915-3918.
- Felsher DW. (2008). "Oncogene addiction versus oncogene amnesia: perhaps more than just a bad habit?" *Cancer research*, 68(9): 3081-3086; discussion 3086.
- Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, Young HM and Haddad BR. (1999). "Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood". *J Clin Endocrinol Metab*, 84(3): 1116-1121.
- Findlay JC, Sheeler LR, Engeland WC and Aron DC. (1993). "Familial adrenocorticotropin-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia". *J Clin Endocrinol Metab*, 76(1): 189-191.
- Fragoso MC, Domenice S, Latronico AC, Martin RM, Pereira MA, Zerbini MC, Lucon AM and Mendonca BB. (2003). "Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene". *J Clin Endocrinol Metab*, 88(5): 2147-2151.
- Frigeri C, Tsao J, Cordova M and Schimmer BP. (2002). "A polymorphic form of steroidogenic factor-1 is associated with adrenocorticotropin resistance in y1 mouse adrenocortical tumor cell mutants". *Endocrinology*, 143(10): 4031-4037.
- Fruhling J, Penasse W, Sand G, Mrena E and Claude A. (1970). "[Comparative study by electron microscopy of cytochemical reactions of digitonin with cholesterol and other lipids in adrenal cortex cells]". *Archives internationales de physiologie et de biochimie*, 78(5): 997-998.
- Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Wu X and Ronai Z. (1998a). "Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination". *Oncogene*, 17(19): 2543-2547.
- Fuchs SY, Adler V, Pincus MR and Ronai Z. (1998b). "MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(18): 10541-10546.
- Fuhrman SA, Lasky LC and Limas C. (1982). "Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma". *Am J Surg Pathol*, 6(7): 655-663.
- Fujita M, Furukawa Y, Tsunoda T, Tanaka T, Ogawa M and Nakamura Y. (2001). "Up-regulation of the ectodermal-neural crest 1 (ENC1) gene, a downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex, in colorectal carcinomas". *Cancer research*, 61(21): 7722-7726.
- Gao ZH, Suppola S, Liu J, Heikkila P, Janne J and Voutilainen R. (2002). "Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors". *J Clin Endocrinol Metab*, 87(3): 1170-1176.
- Gashler A and Sukhatme VP. (1995). "Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors". *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 50(191-224).
- Gaston V, Le Bouc Y, Soupre V, Burglen L, Donadieu J, Oro H, Audry G, Vazquez MP and Gicquel C. (2001). "Analysis of the methylation status of the KCNQ1OT and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome". *Eur J Hum Genet*, 9(6): 409-418.
- Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA *et al.* (1990). "Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis". *Cancer research*, 50(17): 5488-5496.
- Gibbs JB, Sigal IS, Poe M and Scolnick EM. (1984). "Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(18): 5704-5708.
- Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton JP, Girard F and Le Bouc Y. (1994a). "Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors". *J Clin Endocrinol Metab*, 78(6): 1444-1453.
- Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, Louvel A, Chapuis Y, Luton JP, Girard F and Le Bouc Y. (1994b). "Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas". *Clin Endocrinol (Oxf)*, 40(4): 465-477.
- Gicquel C, Dib A, Bertagna X, Amselem S and Le Bouc Y. (1995). "Oncogenic mutations of alpha-Gi2 protein are not determinant for human adrenocortical tumorigenesis". *Eur J Endocrinol*, 133(2): 166-172.

- Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, Louvel A, Luton JP and Le Bouc Y. (1997). "Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors". *J Clin Endocrinol Metab*, 82(8): 2559-2565.
- Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, Bertherat J, Chapuis Y, Duclos JM *et al.* (2001). "Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors". *Cancer research*, 61(18): 6762-6767.
- Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, Danton F, Thibaud N, Le Merrer M *et al.* (2005). "Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome". *Nat Genet*, 37(9): 1003-1007.
- Giles RH, van Es JH and Clevers H. (2003). "Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer". *Biochim Biophys Acta*, 1653(1): 1-24.
- Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG *et al.* (2003). "Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis". *Am J Pathol*, 162(2): 521-531.
- Goessel G, Quante M, Hahn WC, Harada H, Heeg S, Suliman Y, Doebele M, von Werder A, Fulda C *et al.* (2005). "Creating oral squamous cancer cells: a cellular model of oral-esophageal carcinogenesis". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(43): 15599-15604.
- Gonzalez-Garcia A, Pritchard CA, Paterson HF, Mavria G, Stamp G and Marshall CJ. (2005). "RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis". *Cancer cell*, 7(3): 219-226.
- Gordon R, Gartside M, Tunny T and Stowasser M. (1996). "Different allelic patterns at chromosome 11q13 in paired aldosterone-producing tumours and blood DNA". *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 23(6-7): 594-596.
- Gortz B, Roth J, Speel EJ, Krahenmann A, De Krijger RR, Matias-Guiu X, Muletta-Feurer S, Rutmann K, Saremaslani P *et al.* (1999). "MEN1 gene mutation analysis of sporadic adrenocortical lesions". *Int J Cancer*, 80(3): 373-379.
- Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Jr. and Giaccia AJ. (1994). "Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status". *Mol Cell Biol*, 14(9): 6264-6277.
- Grandis JR and Sok JC. (2004). "Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy". *Pharmacology & therapeutics*, 102(1): 37-46.
- Gray DA, Inazawa J, Gupta K, Wong A, Ueda R and Takahashi T. (1995). "Elevated expression of Unph, a proto-oncogene at 3p21.3, in human lung tumors". *Oncogene*, 10(11): 2179-2183.
- Groussin L, Cazabat L, Rene-Corail F, Jullian E and Bertherat J. (2005). "Adrenal pathophysiology: lessons from the Carney complex". *Hormone research*, 64(3): 132-139.
- Guillouf C, Rosselli F, Krishnaraju K, Moustacchi E, Hoffman B and Liebermann DA. (1995). "p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis". *Oncogene*, 10(11): 2263-2270.
- Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, Hiraoka N, Wakazono K, Seki S, Fukushima S, Tsao MS, Sugimura T *et al.* (2004). "Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers". *Oncogene*, 23(53): 8705-8710.
- Hahn WC, Dessain SK, Brooks MW, King JE, Elenbaas B, Sabatini DM, DeCaprio JA and Weinberg RA. (2002). "Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation". *Mol Cell Biol*, 22(7): 2111-2123.
- Hahn WC and Weinberg RA. (2002). "Modelling the molecular circuitry of cancer". *Nat Rev Cancer*, 2(5): 331-341.
- Hanahan D and Weinberg RA. (2000). "The hallmarks of cancer". *Cell*, 100(1): 57-70.
- Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E and Tycko B. (1993). "Tumour-suppressor activity of H19 RNA". *Nature*, 365(6448): 764-767.

- Harrison LE, Gaudin PB and Brennan MF. (1999). "Pathologic features of prognostic significance for adrenocortical carcinoma after curative resection". *Arch Surg*, 134(2): 181-185.
- Hatada I and Mukai T. (1995). "Genomic imprinting of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse". *Nat Genet*, 11(2): 204-206.
- He X, Semenov M, Tamai K and Zeng X. (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way". *Development (Cambridge, England)*, 131(8): 1663-1677.
- Hendrix ND, Wu R, Kuick R, Schwartz DR, Fearon ER and Cho KR. (2006). "Fibroblast growth factor 9 has oncogenic activity and is a downstream target of Wnt signaling in ovarian endometrioid adenocarcinomas". *Cancer research*, 66(3): 1354-1362.
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y and Mills GB. (2005). "Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery". *Nature reviews*, 4(12): 988-1004.
- Heppner C, Reincke M, Agarwal SK, Mora P, Allolio B, Burns AL, Spiegel AM and Marx SJ. (1999). "MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms". *J Clin Endocrinol Metab*, 84(1): 216-219.
- Hirano Y, Fujita K, Suzuki K, Ushiyama T, Ohtawara Y and Tsuda F. (1998). "Telomerase activity as an indicator of potentially malignant adrenal tumors". *Cancer*, 83(4): 772-776.
- Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF, Jr. and Li FP. (1998). "Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome". *Journal of the National Cancer Institute*, 90(8): 606-611.
- Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Hansen MA, Skakkebaek NE, Rajpert-DeMeyts E and Leffers H. (2004). "Identification of genes differentially expressed in testes containing carcinoma in situ". *Molecular human reproduction*, 10(6): 423-431.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R *et al.* (1994). "Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines". *Nucleic acids research*, 22(17): 3551-3555.
- Hornsby PJ, Thomas M, Northrup SR, Popnikolov NK, Wang X, Tunstead JR and Zheng J. (1998). "Cell transplantation: a tool to study adrenocortical cell biology, physiology, and senescence". *Endocr Res*, 24(3-4): 909-918.
- Hoschuetzky H, Aberle H and Kemler R. (1994). "Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor". *The Journal of cell biology*, 127(5): 1375-1380.
- Hotta M and Baird A. (1986). "Differential effects of transforming growth factor type beta on the growth and function of adrenocortical cells in vitro". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(20): 7795-7799.
- Hough AJ, Hollifield JW, Page DL and Hartmann WH. (1979). "Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data". *American journal of clinical pathology*, 72(3): 390-399.
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG and Kemler R. (1996). "Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1". *Mechanisms of development*, 59(1): 3-10.
- Hulsken J, Birchmeier W and Behrens J. (1994). "E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton". *The Journal of cell biology*, 127(6 Pt 2): 2061-2069.
- Hupp TR and Lane DP. (1994). "Allosteric activation of latent p53 tetramers". *Curr Biol*, 4(10): 865-875.
- Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, Cougard P, Henry JF and Proye C. (2001). "Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group". *World journal of surgery*, 25(7): 891-897.
- Idelman S and Verdeti J. (2000). "Chapitre 6 : les glandes surrénales". *Endocrinologie et communications cellulaires. Ed. E. Sciences, Grenoble*, 584.
- Iida A, Blake K, Tunny T, Klemm S, Stowasser M, Hayward N, Gordon R, Nakamura Y and Imai T. (1995). "Allelic losses on chromosome band 11q13 in aldosterone-producing adrenal tumors". *Genes, chromosomes & cancer*, 12(1): 73-75.
- Iida S, Fujii H and Moriwaki K. (1997). "A somatic mutation of the p21(Waf1/Cip1) gene in a human adrenocortical adenoma". *Anticancer Res*, 17(1B): 633-636.



- Ilvesmaki V, Jaattela M, Saksela E and Voutilainen R. (1993a). "Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin-like growth factor II gene expression in human fetal adrenal cell cultures". *Mol Cell Endocrinol*, 91(1-2): 59-65.
- Ilvesmaki V, Kahri AI, Miettinen PJ and Voutilainen R. (1993b). "Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas". *J Clin Endocrinol Metab*, 77(3): 852-858.
- Itahana K, Dimri G and Campisi J. (2001). "Regulation of cellular senescence by p53". *European journal of biochemistry / FEBS*, 268(10): 2784-2791.
- Jayaraman J and Prives C. (1995). "Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus". *Cell*, 81(7): 1021-1029.
- Jefcoate CR, DiBartolomeis MJ, Williams CA and McNamara BC. (1987). "ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells". *Journal of steroid biochemistry*, 27(4-6): 721-729.
- John ME, John MC, Boggaram V, Simpson ER and Waterman MR. (1986). "Transcriptional regulation of steroid hydroxylase genes by corticotropin". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(13): 4715-4719.
- Johnson GL and Lapadat R. (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases". *Science*, 298(5600): 1911-1912.
- Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ and Marrs JA. (1995). "Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11): 5067-5071.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS, 3rd, Johnson BE *et al.* (1994). "A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types". *Science*, 264(5157): 436-440.
- Kamio T, Shigematsu K, Sou H, Kawai K and Tsuchiyama H. (1990). "Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma". *Human pathology*, 21(3): 277-282.
- Kananen K, Markkula M, Mikola M, Rainio EM, McNeilly A and Huhtaniemi I. (1996). "Gonadectomy permits adrenocortical tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin alpha-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen fusion gene: evidence for negative autoregulation of the inhibin alpha-subunit gene". *Mol Endocrinol*, 10(12): 1667-1677.
- Kanauchi H, Wada N, Clark OH and Duh QY. (2002). "Apoptosis regulating genes, bcl-2 and bax, and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA expression in adrenal tumors: possible diagnostic and prognostic importance". *Surgery*, 132(6): 1021-1026; discussion 1026-1027.
- Karakousis CP, Rao U and Moore R. (1985). "Adrenal adenocarcinomas: histologic grading and survival". *J Surg Oncol*, 29(2): 105-111.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig RW. (1991). "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage". *Cancer research*, 51(23 Pt 1): 6304-6311.
- Kebebew E, Reiff E, Duh QY, Clark OH and McMillan A. (2006). "Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: have we made progress?" *World journal of surgery*, 30(5): 872-878.
- Kemler R. (1993). "From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion". *Trends Genet*, 9(9): 317-321.
- Kendall SD, Linardic CM, Adam SJ and Counter CM. (2005). "A network of genetic events sufficient to convert normal human cells to a tumorigenic state". *Cancer research*, 65(21): 9824-9828.
- Kendrick ML, Lloyd R, Erickson L, Farley DR, Grant CS, Thompson GB, Rowland C, Young WF, Jr. and van Heerden JA. (2001). "Adrenocortical carcinoma: surgical progress or status quo?" *Arch Surg*, 136(5): 543-549.
- Kiiveri S, Siltanen S, Rahman N, Bielinska M, Lehto VP, Huhtaniemi IT, Muglia LJ, Wilson DB and Heikinheimo M. (1999). "Reciprocal changes in the expression of transcription factors GATA-4 and GATA-6 accompany adrenocortical tumorigenesis in mice and humans". *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*, 5(7): 490-501.
- Kiiveri S, Liu J, Heikkila P, Arola J, Lehtonen E, Voutilainen R and Heikinheimo M. (2004). "Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in human adrenocortical tumors". *Endocr Res*, 30(4): 919-923.

- Kiiveri S, Liu J, Arola J, Heikkilä P, Kuulasmaa T, Lehtonen E, Voutilainen R and Heikinheimo M. (2005). "Transcription factors GATA-6, SF-1, and cell proliferation in human adrenocortical tumors". *Mol Cell Endocrinol*, 233(1-2): 47-56.
- Kikuchi A. (2003). "Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway". *Cancer science*, 94(3): 225-229.
- Kim HJ and Kim TY. (2005). "Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-II in human keratinocytes, differential involvement of mitogen-activated protein kinases and feedback inhibition of protein kinase C". *The British journal of dermatology*, 152(3): 418-425.
- Kim KW, Bae SK, Lee OH, Bae MH, Lee MJ and Park BC. (1998). "Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma". *Cancer research*, 58(2): 348-351.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL *et al.* (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer". *Science*, 266(5193): 2011-2015.
- Kinoshita H, Ogawa O, Mishina M, Oka H, Okumura K, Yamabe H, Terachi T and Yoshida O. (1998). "Telomerase activity in adrenal cortical tumors and pheochromocytomas with reference to clinicopathologic features". *Urological research*, 26(1): 29-32.
- Kinzler KW and Vogelstein B. (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer". *Cell*, 87(2): 159-170.
- Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS and Stratakis CA. (2000a). "Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I- $\alpha$  regulatory subunit in patients with the Carney complex". *Nat Genet*, 26(1): 89-92.
- Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Lin JP, Carney JA and Stratakis CA. (2000b). "Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex". *Hum Mol Genet*, 9(20): 3037-3046.
- Kirschner LS. (2006). "Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope". *J Clin Endocrinol Metab*, 91(1): 14-21.
- Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Hoog A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C and Backdahl M. (1996). "Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy". *Cancer research*, 56(18): 4219-4223.
- Kjellman M, Roshani L, Teh BT, Kallioniemi OP, Hoog A, Gray S, Farnebo LO, Holst M, Backdahl M *et al.* (1999). "Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16". *J Clin Endocrinol Metab*, 84(2): 730-735.
- Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M and Shapiro B. (1995). "Incidentally discovered adrenal masses". *Endocr Rev*, 16(4): 460-484.
- Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR and Wheelock MJ. (1995). "Interaction of  $\alpha$ -actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via  $\alpha$ -catenin". *The Journal of cell biology*, 130(1): 67-77.
- Knudson AG. (1996). "Hereditary cancer: two hits revisited". *Journal of cancer research and clinical oncology*, 122(3): 135-140.
- Knudson AG, Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(4): 820-823.
- Kobayashi H, Usui T, Fukata J, Yoshimasa T, Oki Y and Nakao K. (2000). "Mutation analysis of Gs $\alpha$ , adrenocorticotropin receptor and p53 genes in Japanese patients with adrenocortical neoplasms: including a case of Gs $\alpha$  mutation". *Endocr J*, 47(4): 461-466.
- Kobielak A and Fuchs E. (2004). "Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics". *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(8): 614-625.
- Koch CA, Pacak K and Chrousos GP. (2002). "The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors". *J Clin Endocrinol Metab*, 87(12): 5367-5384.
- Kolomecki K, Stepień H, Bartos M and Kuzdak K. (2001). "Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours". *Endocrine regulations*, 35(1): 9-16.

- Kramer RE, Rainey WE, Funkenstein B, Dee A, Simpson ER and Waterman MR. (1984). "Induction of synthesis of mitochondrial steroidogenic enzymes of bovine adrenocortical cells by analogs of cyclic AMP". *J Biol Chem*, 259(2): 707-713.
- Kwon YW, Kwon KS, Moon HE, Park JA, Choi KS, Kim YS, Jang HS, Oh CK, Lee YM *et al.* (2004). "Insulin-like growth factor-II regulates the expression of vascular endothelial growth factor by the human keratinocyte cell line HaCaT". *The Journal of investigative dermatology*, 123(1): 152-158.
- Lam WW, Hatada I, Ohishi S, Mukai T, Joyce JA, Cole TR, Donnai D, Reik W, Schofield PN *et al.* (1999). "Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation". *J Med Genet*, 36(7): 518-523.
- Lambert JM, Lambert QT, Reuther GW, Malliri A, Siderovski DP, Sondek J, Collard JG and Der CJ. (2002). "Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism". *Nature cell biology*, 4(8): 621-625.
- Lane DP. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome". *Nature*, 358(6381): 15-16.
- Latronico AC, Mendonca BB, Bianco AC, Villares SM, Lucon MA, Nicolau W and Wajchenberg BL. (1994). "Calcium-dependent protein kinase-C activity in human adrenocortical neoplasms, hyperplastic adrenals, and normal adrenocortical tissue". *J Clin Endocrinol Metab*, 79(3): 736-739.
- Latronico AC, Reincke M, Mendonca BB, Arai K, Mora P, Allolio B, Wajchenberg BL, Chrousos GP and Tsigos C. (1995). "No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms". *J Clin Endocrinol Metab*, 80(3): 875-877.
- Latronico AC. (2000). "Role of ACTH receptor in adrenocortical tumor formation". *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al]*, 33(10): 1249-1252.
- Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM and Mendonca BB. (2001). "An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors". *J Clin Endocrinol Metab*, 86(10): 4970-4973.
- Lazarov M, Kubo Y, Cai T, Dajee M, Tarutani M, Lin Q, Fang M, Tao S, Green CL *et al.* (2002). "CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis". *Nat Med*, 8(10): 1105-1114.
- Le Bouc Y, Noguez P, Sondermeijer P, Dreyer D, Girard F and Binoux M. (1987). "A new 5'-non-coding region for human placental insulin-like growth factor II mRNA expression". *FEBS Lett*, 222(1): 181-185.
- Leboulleux S, Gaston V, Boulle N, Le Bouc Y and Gicquel C. (2001). "Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor locus: a frequent but late event in adrenocortical tumorigenesis". *Eur J Endocrinol*, 144(2): 163-168.
- Lee MH, Reynisdottir I and Massague J. (1995). "Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution". *Genes Dev*, 9(6): 639-649.
- Lefkowitz RJ, Roth J and Pastan I. (1971). "ACTH-receptor interaction in the adrenal: a model for the initial step in the action of hormones that stimulate adenyl cyclase". *Ann N Y Acad Sci*, 185(195-209).
- Lefrancois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Gallo-Payet N, Hyndman D, Veyssiere G, Bertagna X, Jean C *et al.* (2004). "Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors". *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6): 3010-3019.
- Levine AJ. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division". *Cell*, 88(3): 323-331.
- Li FP and Fraumeni JF, Jr. (1969). "Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome?" *Ann Intern Med*, 71(4): 747-752.
- Libé R and Bertherat J. (2005). "Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases". *Eur J Endocrinol*, 153(4): 477-487.
- Libé R, Fratticci A and Bertherat J. (2007a). "Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management". *Endocrine-related cancer*, 14(1): 13-28.

- Libé R, Groussin L, Tissier F, Elie C, Rene-Corail F, Fratticci A, Jullian E, Beck-Peccoz P, Bertagna X *et al.* (2007b). "Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity". *Clin Cancer Res*, 13(3): 844-850.
- Lieberman SA, Eccleshall TR and Feldman D. (1994). "ACTH-independent massive bilateral adrenal disease (AIMBAD): a subtype of Cushing's syndrome with major diagnostic and therapeutic implications". *Eur J Endocrinol*, 131(1): 67-73.
- Light K, Jenkins PJ, Weber A, Perrett C, Grossman A, Pistorello M, Asa SL, Clayton RN and Clark AJ. (1995). "Are activating mutations of the adrenocorticotropin receptor involved in adrenal cortical neoplasia?" *Life Sci*, 56(18): 1523-1527.
- Lilien J and Balsamo J. (2005). "The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin". *Current opinion in cell biology*, 17(5): 459-465.
- Lim KH, Baines AT, Fiordalisi JJ, Shipitsin M, Feig LA, Cox AD, Der CJ and Counter CM. (2005). "Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells". *Cancer cell*, 7(6): 533-545.
- Lim KH and Counter CM. (2005). "Reduction in the requirement of oncogenic Ras signaling to activation of PI3K/AKT pathway during tumor maintenance". *Cancer cell*, 8(5): 381-392.
- Limon J, Dal Cin P, Kakati S, Huben RP and Sandberg AA. (1987). "Cytogenetic findings in a primary adrenocortical carcinoma". *Cancer Genet Cytogenet*, 26(2): 271-277.
- Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M and Lowe SW. (1998a). "Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling". *Genes Dev*, 12(19): 3008-3019.
- Lin SR, Lee YJ and Tsai JH. (1994). "Mutations of the p53 gene in human functional adrenal neoplasms". *J Clin Endocrinol Metab*, 78(2): 483-491.
- Lin SR, Tsai JH, Yang YC and Lee SC. (1998b). "Mutations of K-ras oncogene in human adrenal tumours in Taiwan". *British journal of cancer*, 77(7): 1060-1065.
- Lin SR, Yang YC, Tsai JH and Hsu CH. (1998c). "Alterations of RET oncogene in human adrenal tumors". *Jpn J Cancer Res*, 89(6): 634-640.
- Liscovitch M. (1996). "Phospholipase D: role in signal transduction and membrane traffic". *Journal of lipid mediators and cell signalling*, 14(1-3): 215-221.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X and He X. (2002). "Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism". *Cell*, 108(6): 837-847.
- Liu J, Kahri AI, Heikkila P and Voutilainen R. (1997). "Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, p57KIP2, insulin-like growth factor II, and H19, in adrenal tumors and cultured adrenal cells". *J Clin Endocrinol Metab*, 82(6): 1766-1771.
- Liu Y and Kulesz-Martin M. (2001). "p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding". *Carcinogenesis*, 22(6): 851-860.
- Logan CY and Nusse R. (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease". *Annual review of cell and developmental biology*, 20(781-810).
- Logié A, Boule N, Gaston V, Perin L, Boudou P, Le Bouc Y and Gicquel C. (1999). "Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line". *J Mol Endocrinol*, 23(1): 23-32.
- Logié A, Boudou P, Boccon-Gibod L, Baudin E, Vassal G, Schlumberger M, Le Bouc Y and Gicquel C. (2000). "Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma xenograft model". *Endocrinology*, 141(9): 3165-3171.
- Longo KA, Kennell JA, Ochocinska MJ, Ross SE, Wright WS and MacDougald OA. (2002). "Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors". *J Biol Chem*, 277(41): 38239-38244.
- Looyenga BD and Hammer GD. (2006). "Origin and identity of adrenocortical tumors in inhibin knockout mice: implications for cellular plasticity in the adrenal cortex". *Mol Endocrinol*, 20(11): 2848-2863.
- Lowe SW. (1999). "Activation of p53 by oncogenes". *Endocrine-related cancer*, 6(1): 45-48.

- Lumbroso S, Paris F and Sultan C. (2002). "McCune-Albright syndrome: molecular genetics". *J Pediatr Endocrinol Metab*, 15 Suppl 3(875-882).
- Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y *et al.* (1990). "Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy". *The New England journal of medicine*, 322(17): 1195-1201.
- Luton JP, Martinez M, Coste J and Bertherat J. (2000). "Outcome in patients with adrenal incidentaloma selected for surgery: an analysis of 88 cases investigated in a single clinical center". *Eur J Endocrinol*, 143(1): 111-117.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG *et al.* (2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib". *The New England journal of medicine*, 350(21): 2129-2139.
- Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grunewald K, Feichtinger H, Duh QY, Clark OH, Kawasaki E *et al.* (1990). "Two G protein oncogenes in human endocrine tumors". *Science*, 249(4969): 655-659.
- Maher ER and Reik W. (2000). "Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited". *J Clin Invest*, 105(3): 247-252.
- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ *et al.* (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms". *Science*, 250(4985): 1233-1238.
- Malliri A, van der Kammen RA, Clark K, van der Valk M, Michiels F and Collard JG. (2002). "Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours". *Nature*, 417(6891): 867-871.
- Malumbres M and Barbacid M. (2003). "RAS oncogenes: the first 30 years". *Nat Rev Cancer*, 3(6): 459-465.
- Manfredi JJ and Prives C. (1994). "The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen". *Biochim Biophys Acta*, 1198(1): 65-83.
- Mannelli M, Gelmini S, Arnaldi G, Becherini L, Bemporad D, Crescioli C, Pazzagli M, Mantero F, Serio M *et al.* (2000). "Telomerase activity is significantly enhanced in malignant adrenocortical tumors in comparison to benign adrenocortical adenomas". *J Clin Endocrinol Metab*, 85(1): 468-470.
- Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y and Bornstein SR. (2004). "The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management". *Endocr Rev*, 25(2): 309-340.
- Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini AM, Ali A, Giovagnetti M, Opocher G and Angeli A. (2000). "A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology". *J Clin Endocrinol Metab*, 85(2): 637-644.
- Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D *et al.* (2001). "Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway". *Mol Cell*, 7(4): 801-809.
- Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW and Elledge SJ. (1995). "p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene". *Genes Dev*, 9(6): 650-662.
- Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H and Bradley A. (1994). "Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(19): 8817-8821.
- May P and May E. (1999). "Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein". *Oncogene*, 18(53): 7621-7636.
- Mayo LD and Donner DB. (2001). "A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20): 11598-11603.
- Mayo MW, Wang CY, Cogswell PC, Rogers-Graham KS, Lowe SW, Der CJ and Baldwin AS, Jr. (1997). "Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras". *Science*, 278(5344): 1812-1815.
- McBride OW, Merry D and Givol D. (1986). "The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13)". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(1): 130-134.

- McCann AH, Miller N, O'Meara A, Pedersen I, Keogh K, Gorey T and Dervan PA. (1996). "Biallelic expression of the IGF2 gene in human breast disease". *Hum Mol Genet*, 5(8): 1123-1127.
- McFall A, Ulku A, Lambert QT, Kusa A, Rogers-Graham K and Der CJ. (2001). "Oncogenic Ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase". *Mol Cell Biol*, 21(16): 5488-5499.
- Mertens F, Kullendorff CM, Moell C, Alumets J and Mandahl N. (1998). "Complex karyotype in a childhood adrenocortical carcinoma". *Cancer Genet Cytogenet*, 105(2): 190-192.
- Mesiano S, Mellon SH, Gospodarowicz D, Di Blasio AM and Jaffe RB. (1991). "Basic fibroblast growth factor expression is regulated by corticotropin in the human fetal adrenal: a model for adrenal growth regulation". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(12): 5428-5432.
- Mesiano S, Mellon SH and Jaffe RB. (1993). "Mitogenic action, regulation, and localization of insulin-like growth factors in the human fetal adrenal gland". *J Clin Endocrinol Metab*, 76(4): 968-976.
- Minami S, Sugihara H, Sato J, Tatsukuchi A, Sugisaki Y, Sasano H and Wakabayashi I. (1996). "ACTH independent Cushing's syndrome occurring in siblings". *Clin Endocrinol (Oxf)*, 44(4): 483-488.
- Mitin N, Rossman KL and Der CJ. (2005). "Signaling interplay in Ras superfamily function". *Curr Biol*, 15(14): R563-574.
- Mocellin S, Wang E, Panelli M, Pilati P and Marincola FM. (2004). "DNA array-based gene profiling in tumor immunology". *Clin Cancer Res*, 10(14): 4597-4606.
- Moll UM, Riou G and Levine AJ. (1992). "Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15): 7262-7266.
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV and Kaykas A. (2004). "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies". *Nat Rev Genet*, 5(9): 691-701.
- Morales CP, Holt SE, Ouellette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, White MA, Wright WE and Shay JW. (1999). "Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase". *Nat Genet*, 21(1): 115-118.
- Morali OG, Delmas V, Moore R, Jeanney C, Thiery JP and Larue L. (2001). "IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition". *Oncogene*, 20(36): 4942-4950.
- Moran E. (1993). "DNA tumor virus transforming proteins and the cell cycle". *Curr Opin Genet Dev*, 3(1): 63-70.
- Morison IM and Reeve AE. (1998). "Insulin-like growth factor 2 and overgrowth: molecular biology and clinical implications". *Molecular medicine today*, 4(3): 110-115.
- Mostowska A, Biedziak B and Jagodzinski PP. (2006). "Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis". *Journal of human genetics*, 51(3): 262-266.
- Moul JW, Bishoff JT, Theune SM and Chang EH. (1993). "Absent ras gene mutations in human adrenal cortical neoplasms and pheochromocytomas". *J Urol*, 149(6): 1389-1394.
- Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W and Grosse F. (1996). "p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity". *Cell*, 85(7): 1089-1099.
- Munemitsu S, Albert I, Rubinfeld B and Polakis P. (1996). "Deletion of an amino-terminal sequence beta-catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein". *Mol Cell Biol*, 16(8): 4088-4094.
- Neville AM and O'Hare MJ. (1985). "Histopathology of the human adrenal cortex". *Clin Endocrinol Metab*, 14(4): 791-820.
- Nordling CO. (1953). "A new theory on cancer-inducing mechanism". *British journal of cancer*, 7(1): 68-72.
- Nussdorfer GG. (1986). "Cytophysiology of the adrenal cortex". *Int Rev Cytol*, 98(1-405).
- Ocker M, Sachse R, Rico A and Hensen J. (2000). "PCR-SSCP analysis of human adrenocortical adenomas: absence of K-ras gene mutations". *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 108(8): 513-514.

- Oh JC, Wu W, Tortolero-Luna G, Broaddus R, Gershenson DM, Burke TW, Schmandt R and Lu KH. (2004). "Increased plasma levels of insulin-like growth factor 2 and insulin-like growth factor binding protein 3 are associated with endometrial cancer risk". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13(5): 748-752.
- Ohgaki H, Kleihues P and Heitz PU. (1993). "p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors". *Int J Cancer*, 54(3): 408-410.
- Ohlsson R, Renkawitz R and Lobanenko V. (2001). "CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease". *Trends Genet*, 17(9): 520-527.
- Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW and Vogelstein B. (1993). "Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53". *Nature*, 362(6423): 857-860.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC and Hainaut P. (2002). "The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users". *Hum Mutat*, 19(6): 607-614.
- Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM and Byers SW. (1997). "Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin". *J Biol Chem*, 272(40): 24735-24738.
- Pal S, Datta K and Mukhopadhyay D. (2001). "Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma". *Cancer research*, 61(18): 6952-6957.
- Pannett AA and Thakker RV. (2001). "Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson "two-hit" hypothesis". *J Clin Endocrinol Metab*, 86(9): 4371-4374.
- Papadopoulos V. (1998). "Structure and function of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenic cells". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.*, 217(2): 130-142.
- Parviainen H, Kiiveri S, Bielinska M, Rahman N, Huhtaniemi IT, Wilson DB and Heikinheimo M. (2007). "GATA transcription factors in adrenal development and tumors". *Mol Cell Endocrinol*, 265-266(17-22).
- Pavletich NP, Chambers KA and Pabo CO. (1993). "The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots". *Genes Dev*, 7(12B): 2556-2564.
- Perrin A, Pascal O, Defaye G, Feige JJ and Chambaz EM. (1991). "Transforming growth factor beta 1 is a negative regulator of steroid 17 alpha-hydroxylase expression in bovine adrenocortical cells". *Endocrinology*, 128(1): 357-362.
- Petley T, Graff K, Jiang W, Yang H and Florini J. (1999). "Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses". *Hormone and metabolic research. Hormon- und Stoffwechselforschung*, 31(2-3): 70-76.
- Pilon C, Pistorello M, Moscon A, Altavilla G, Pagotto U, Boscaro M and Fallo F. (1999). "Inactivation of the p16 tumor suppressor gene in adrenocortical tumors". *J Clin Endocrinol Metab*, 84(8): 2776-2779.
- Polakis P. (2000). "Wnt signaling and cancer". *Genes Dev*, 14(15): 1837-1851.
- Polakis P. (2007). "The many ways of Wnt in cancer". *Curr Opin Genet Dev*, 17(1): 45-51.
- Popnikolov NK and Hornsby PJ. (1999). "Subcutaneous transplantation of bovine and human adrenocortical cells in collagen gel in scid mice". *Cell transplantation*, 8(6): 617-625.
- Prawitt D, Enklaar T, Gartner-Rupprecht B, Spangenberg C, Oswald M, Lausch E, Schmidtke P, Reutzel D, Fees S et al. (2005). "Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(11): 4085-4090.
- Pruitt K and Der CJ. (2001). "Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis". *Cancer Lett*, 171(1): 1-10.
- Rahman NA, Kiiveri S, Rivero-Muller A, Levallet J, Vierre S, Kero J, Wilson DB, Heikinheimo M and Huhtaniemi I. (2004). "Adrenocortical tumorigenesis in transgenic mice expressing the inhibin alpha-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen transgene: relationship between ectopic expression of luteinizing hormone receptor and transcription factor GATA-4". *Mol Endocrinol*, 18(10): 2553-2569.
- Rainey WE, Bird IM and Mason JJ. (1994). "The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies". *Mol Cell Endocrinol*, 100(1-2): 45-50.

- Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE and Feinberg AP. (1993). "Relaxation of imprinted genes in human cancer". *Nature*, 362(6422): 747-749.
- Ravenel JD, Broman KW, Perlman EJ, Niemitz EL, Jayawardena TM, Bell DW, Haber DA, Uejima H and Feinberg AP. (2001). "Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor". *Journal of the National Cancer Institute*, 93(22): 1698-1703.
- Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL *et al.* (2000). "Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha". *Genes Dev*, 14(1): 34-44.
- Reik W, Constancia M, Dean W, Davies K, Bowden L, Murrell A, Feil R, Walter J and Kelsey G. (2000). "Igf2 imprinting in development and disease". *The International journal of developmental biology*, 44(1): 145-150.
- Reincke M, Karl M, Travis W and Chrousos GP. (1993). "No evidence for oncogenic mutations in guanine nucleotide-binding proteins of human adrenocortical neoplasms". *J Clin Endocrinol Metab*, 77(5): 1419-1422.
- Reincke M, Karl M, Travis WH, Mastorakos G, Allolio B, Linehan HM and Chrousos GP. (1994). "p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies". *J Clin Endocrinol Metab*, 78(3): 790-794.
- Reincke M, Wachenfeld C, Mora P, Thumser A, Jaursch-Hancke C, Abdelhamid S, Chrousos GP and Allolio B. (1996). "p53 mutations in adrenal tumors: Caucasian patients do not show the exon 4 "hot spot" found in Taiwan". *J Clin Endocrinol Metab*, 81(10): 3636-3638.
- Reincke M, Mora P, Beuschlein F, Arlt W, Chrousos GP and Allolio B. (1997). "Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis". *J Clin Endocrinol Metab*, 82(9): 3054-3058.
- Reincke M, Beuschlein F, Menig G, Hofmockel G, Arlt W, Lehmann R, Karl M and Allolio B. (1998). "Localization and expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex". *J Endocrinol*, 156(3): 415-423.
- Repasky GA, Chenette EJ and Der CJ. (2004). "Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?" *Trends Cell Biol*, 14(11): 639-647.
- Reya T and Clevers H. (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer". *Nature*, 434(7035): 843-850.
- Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C *et al.* (2001). "An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16): 9330-9335.
- Rilianawati, Pauku T, Kero J, Zhang FP, Rahman N, Kananen K and Huhtaniemi I. (1998). "Direct luteinizing hormone action triggers adrenocortical tumorigenesis in castrated mice transgenic for the murine inhibin alpha-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen fusion gene". *Mol Endocrinol*, 12(6): 801-809.
- Roberts PJ and Der CJ. (2007). "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer". *Oncogene*, 26(22): 3291-3310.
- Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD and Downward J. (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras". *Nature*, 370(6490): 527-532.
- Romashkova JA and Makarov SS. (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling". *Nature*, 401(6748): 86-90.
- Rosenberg D, Groussin L, Bertagna X and Bertherat J. (2002). "cAMP pathway alterations from the cell surface to the nucleus in adrenocortical tumors". *Endocr Res*, 28(4): 765-775.
- Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Medjane S, Louvel A, Bertagna X and Bertherat J. (2003). "Transcription factor 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-responsive element-binding protein (CREB) is decreased during human adrenal cortex tumorigenesis and fetal development". *J Clin Endocrinol Metab*, 88(8): 3958-3965.
- Ross NS and Aron DC. (1990). "Hormonal evaluation of the patient with an incidentally discovered adrenal mass". *The New England journal of medicine*, 323(20): 1401-1405.



- Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ and Brinckerhoff CE. (1998). "A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription". *Cancer research*, 58(23): 5321-5325.
- Rouvière H. (1962). "Anatomie humaine descriptive et topographie". *Paris, Masson*, 1088-1093.
- Sachse R, Shao XJ, Rico A, Finckh U, Rolfs A, Reincke M and Hensen J. (1997). "Absence of angiotensin II type 1 receptor gene mutations in human adrenal tumors". *Eur J Endocrinol*, 137(3): 262-266.
- Sachsenmeier KF and Pipas JM. (2001). "Inhibition of Rb and p53 is insufficient for SV40 T-antigen transformation". *Virology*, 283(1): 40-48.
- Saeger W and Fassnacht M. (2006). "[Effects of drugs on the adrenal cortex and its tumors.]". *Pathologe*, 27(1): 61-64.
- Sarkaria IS, Stojadinovic A, Talbot SG, Hoos A, Dudas ME, Brennan MF, Ghossein RA and Singh B. (2004). "Squamous cell carcinoma-related oncogene is highly expressed in developing, normal, and adenomatous adrenal tissue but not in aggressive adrenocortical carcinomas". *Surgery*, 136(6): 1122-1128.
- Sasano H, Suzuki T, Shizawa S, Kato K and Nagura H. (1994). "Transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor expression in normal and diseased human adrenal cortex by immunohistochemistry and in situ hybridization". *Mod Pathol*, 7(7): 741-746.
- Schubbert S, Shannon K and Bollag G. (2007). "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer". *Nat Rev Cancer*, 7(4): 295-308.
- Schubert B, Fassnacht M, Beuschlein F, Zenkert S, Allolio B and Reincke M. (2001). "Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms". *Clin Endocrinol (Oxf)*, 54(5): 627-632.
- Schulte KM, Heinze M, Mengel M, Simon D, Scheuring S, Kohrer K and Roher HD. (1999). "MEN I gene mutations in sporadic adrenal adenomas". *Human genetics*, 105(6): 603-610.
- Schulte KM, Mengel M, Heinze M, Simon D, Scheuring S, Kohrer K and Roher HD. (2000). "Complete sequencing and messenger ribonucleic acid expression analysis of the MEN I gene in adrenal cancer". *J Clin Endocrinol Metab*, 85(1): 441-448.
- Schulze A, Nicke B, Warne PH, Tomlinson S and Downward J. (2004). "The transcriptional response to Raf activation is almost completely dependent on Mitogen-activated Protein Kinase activity and shows a major autocrine component". *Molecular biology of the cell*, 15(7): 3450-3463.
- Scopsi L, Sampietro G, Boracchi P and Collini P. (1998). "Argyrophilia and chromogranin A and B immunostaining in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma. A critical appraisal of their prognostic utility". *J Pathol*, 184(4): 414-419.
- Scott CD and Firth SM. (2004). "The role of the M6P/IGF-II receptor in cancer: tumor suppression or garbage disposal?" *Hormone and metabolic research. Hormon- und Stoffwechselforschung*, 36(5): 261-271.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A and Rotter V. (1990). "Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis". *Mol Cell Biol*, 10(12): 6565-6577.
- Shay JW, Zou Y, Hiyama E and Wright WE. (2001). "Telomerase and cancer". *Hum Mol Genet*, 10(7): 677-685.
- Sherr CJ and Weber JD. (2000). "The ARF/p53 pathway". *Curr Opin Genet Dev*, 10(1): 94-99.
- Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A and Der CJ. (2000). "Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'". *Trends Cell Biol*, 10(4): 147-154.
- Shimokawa T, Furukawa Y, Sakai M, Li M, Miwa N, Lin YM and Nakamura Y. (2003). "Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex". *Cancer research*, 63(19): 6116-6120.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R and Ben-Ze'ev A. (1999). "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10): 5522-5527.
- Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, Magarey CJ, Russell CF, Schulte KM et al. (2002). "Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors". *J Clin Endocrinol Metab*, 87(7): 3467-3474.

- Sidhu S, Gicquel C, Bambach CP, Campbell P, Magarey C, Robinson BG and Delbridge LW. (2003). "Clinical and molecular aspects of adrenocortical tumorigenesis". *ANZ J Surg*, 73(9): 727-738.
- Sidhu S, Sywak M, Robinson B and Delbridge L. (2004). "Adrenocortical cancer: recent clinical and molecular advances". *Curr Opin Oncol*, 16(1): 13-18.
- Sidhu S, Martin E, Gicquel C, Melki J, Clark SJ, Campbell P, Magarey CJ, Schulte KM, Roher HD *et al.* (2005). "Mutation and methylation analysis of TP53 in adrenal carcinogenesis". *Eur J Surg Oncol*, 31(5): 549-554.
- Skogseid B, Larsson C, Lindgren PG, Kvanta E, Rastad J, Theodorsson E, Wide L, Wilander E and Oberg K. (1992). "Clinical and genetic features of adrenocortical lesions in multiple endocrine neoplasia type 1". *J Clin Endocrinol Metab*, 75(1): 76-81.
- Slater EP, Diehl SM, Langer P, Samans B, Ramaswamy A, Zielke A and Bartsch DK. (2006). "Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors". *Eur J Endocrinol*, 154(4): 587-598.
- Smakman N, Borel Rinkes IH, Voest EE and Kranenburg O. (2005). "Control of colorectal metastasis formation by K-Ras". *Biochim Biophys Acta*, 1756(2): 103-114.
- Smale ST and Tjian R. (1986). "T-antigen-DNA polymerase alpha complex implicated in simian virus 40 DNA replication". *Mol Cell Biol*, 6(11): 4077-4087.
- Song C, Hu CD, Masago M, Kariyai K, Yamawaki-Kataoka Y, Shibatohe M, Wu D, Satoh T and Kataoka T. (2001). "Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras". *J Biol Chem*, 276(4): 2752-2757.
- Soussi T, Caron de Fromentel C and May P. (1990). "Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution". *Oncogene*, 5(7): 945-952.
- Sparago A, Cerrato F, Vernucci M, Ferrero GB, Silengo MC and Riccio A. (2004). "Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome". *Nat Genet*, 36(9): 958-960.
- Sticchi D, Fassina A, Ganzaroli C, Pasqualetto C, Pessina AC, Nussdorfer GG and Rossi GP. (2006). "Expression of telomerase (hTERT) in aldosterone-producing adrenocortical tumors". *Int J Mol Med*, 17(3): 469-474.
- Stewart PM. (2003). "Chapitre 14 : The adrenal cortex". *Williams Textbook of Endocrinology*. Ed. PR Larsen *et al.* 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia, 1927.
- Stojadinovic A, Ghossein RA, Hoos A, Nissan A, Marshall D, Dudas M, Cordon-Cardo C, Jaques DP and Brennan MF. (2002). "Adrenocortical carcinoma: clinical, morphologic, and molecular characterization". *J Clin Oncol*, 20(4): 941-950.
- Stojadinovic A, Brennan MF, Hoos A, Omeroglu A, Leung DH, Dudas ME, Nissan A, Cordon-Cardo C and Ghossein RA. (2003). "Adrenocortical adenoma and carcinoma: histopathological and molecular comparative analysis". *Mod Pathol*, 16(8): 742-751.
- Stratakis CA. (2003). "Genetics of adrenocortical tumors: gatekeepers, landscapers and conductors in symphony". *Trends Endocrinol Metab*, 14(9): 404-410.
- Sun B, Huang Q, Liu S, Chen M, Hawks CL, Wang L, Zhang C and Hornsby PJ. (2004). "Progressive loss of malignant behavior in telomerase-negative tumorigenic adrenocortical cells and restoration of tumorigenicity by human telomerase reverse transcriptase". *Cancer research*, 64(17): 6144-6151.
- Swain JM, Grant CS, Schlinkert RT, Thompson GB, vanHeerden JA, Lloyd RV and Young WF. (1998). "Corticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia: a clinicopathologic correlation". *Arch Surg*, 133(5): 541-545; discussion 545-546.
- Szymanska K and Hainaut P. (2003). "TP53 and mutations in human cancer". *Acta Biochim Pol*, 50(1): 231-238.
- Tanabe A, Naruse M, Arai K, Naruse K, Yoshimoto T, Seki T, Imaki T, Miyazaki H, Zeng ZP *et al.* (1998). "Gene expression and roles of angiotensin II type 1 and type 2 receptors in human adrenals". *Hormone and metabolic research. Hormon- und Stoffwechselforschung*, 30(8): 490-495.

- Tang CK and Gray GF. (1975). "Adrenocortical neoplasms. Prognosis and morphology". *Urology*, 5(5): 691-695.
- Tang ED, Nunez G, Barr FG and Guan KL. (1999). "Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt". *J Biol Chem*, 274(24): 16741-16746.
- Tauchmanova L, Colao A, Marzano LA, Sparano L, Camera L, Rossi A, Palmieri G, Marzano E, Salvatore M *et al.* (2004). "Adrenocortical carcinomas: twelve-year prospective experience". *World journal of surgery*, 28(9): 896-903.
- Teng L, Tucker O, Malchoff C, Vaughan ED, Jr., Jacobson J and Fahey TJ, 3rd. (1998). "Telomerase activity in the differentiation of benign and malignant adrenal tumors". *Surgery*, 124(6): 1123-1127.
- Teodoro JG, Evans SK and Green MR. (2007). "Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome". *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*,
- Thakker RV. (1998). "Multiple endocrine neoplasia--syndromes of the twentieth century". *J Clin Endocrinol Metab*, 83(8): 2617-2620.
- Thiery JP. (2003). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies". *Current opinion in cell biology*, 15(6): 740-746.
- Thiery JP and Sleeman JP. (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions". *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(2): 131-142.
- Thomas M, Massimi P, Jenkins J and Banks L. (1995). "HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation". *Oncogene*, 10(2): 261-268.
- Thomas M, Northrup SR and Hornsby PJ. (1997). "Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands". *Nat Med*, 3(9): 978-983.
- Thomas M and Hornsby PJ. (1999). "Transplantation of primary bovine adrenocortical cells into scid mice". *Mol Cell Endocrinol*, 153(1-2): 125-136.
- Thomas M, Suwa T, Yang L, Zhao L, Hawks CL and Hornsby PJ. (2002). "Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis: a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells". *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 4(6): 493-500.
- Thorvaldsen JL, Fedoriw AM, Nguyen S and Bartolomei MS. (2006). "Developmental profile of H19 differentially methylated domain (DMD) deletion alleles reveals multiple roles of the DMD in regulating allelic expression and DNA methylation at the imprinted H19/Igf2 locus". *Mol Cell Biol*, 26(4): 1245-1258.
- Tissier F, Louvel A, Grabar S, Hagnere AM, Bertherat J, Vacher-Lavenu MC, Dousset B, Chapuis Y, Bertagna X *et al.* (2004). "Cyclin E correlates with malignancy and adverse prognosis in adrenocortical tumors". *Eur J Endocrinol*, 150(6): 809-817.
- Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlempine K, Fumey G, Hagnere AM, Rene-Corail F, Jullian E, Gicquel C *et al.* (2005). "Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors". *Cancer research*, 65(17): 7622-7627.
- Townsend FM, Cliffe A and Bienz M. (2004). "Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function". *Nature cell biology*, 6(7): 626-633.
- Turner HE, Harris AL, Melmed S and Wass JA. (2003). "Angiogenesis in endocrine tumors". *Endocr Rev*, 24(5): 600-632.
- Ueba T, Nosaka T, Takahashi JA, Shibata F, Florkiewicz RZ, Vogelstein B, Oda Y, Kikuchi H and Hatanaka M. (1994). "Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene by p53 in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(19): 9009-9013.
- van Hengel J, Nollet F, Berx G, van Roy N, Speleman F and van Roy F. (1995). "Assignment of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p22-->p21.3 by fluorescence in situ hybridization". *Cytogenetics and cell genetics*, 70(1-2): 68-70.
- van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D and Moolenaar AJ. (1985). "Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors". *Cancer*, 55(4): 766-773.

- Velazquez-Fernandez D, Laurell C, Geli J, Hoog A, Odeberg J, Kjellman M, Lundeberg J, Hamberger B, Nilsson P *et al.* (2005). "Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy". *Surgery*, 138(6): 1087-1094.
- Veugeliers M, Wilkes D, Burton K, McDermott DA, Song Y, Goldstein MM, La Perle K, Vaughan CJ, O'Hagan A *et al.* (2004). "Comparative PRKAR1A genotype-phenotype analyses in humans with Carney complex and prkar1a haploinsufficient mice". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(39): 14222-14227.
- Vogelstein B and Kinzler KW. (1993). "The multistep nature of cancer". *Trends Genet*, 9(4): 138-141.
- Vogelstein B, Lane D and Levine AJ. (2000). "Surfing the p53 network". *Nature*, 408(6810): 307-310.
- Volante M, Buttiglieri C, Greco E, Berruti A and Papotti M. (2008). "Pathological and molecular features of Adrenocortical Carcinoma: an update". *J Clin Pathol*,
- Vousden KH and Lu X. (2002). "Live or let die: the cell's response to p53". *Nat Rev Cancer*, 2(8): 594-604.
- Vuorenoja S, Rivero-Muller A, Kiiveri S, Bielinska M, Heikinheimo M, Wilson DB, Huhtaniemi IT and Rahman NA. (2007). "Adrenocortical tumorigenesis, luteinizing hormone receptor and transcription factors GATA-4 and GATA-6". *Mol Cell Endocrinol*, 269(1-2): 38-45.
- Wachenfeld C, Beuschlein F, Zwermann O, Mora P, Fassnacht M, Allolio B and Reincke M. (2001). "Discerning malignancy in adrenocortical tumors: are molecular markers useful?" *Eur J Endocrinol*, 145(3): 335-341.
- Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G *et al.* (2000). "Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations". *Cancer*, 88(4): 711-736.
- Wang Y and Prives C. (1995). "Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases". *Nature*, 376(6535): 88-91.
- Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W and Engelhardt D. (1997a). "Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands". *Eur J Endocrinol*, 136(3): 296-303.
- Weber MM, Michl P, Auernhammer CJ and Engelhardt D. (1997b). "Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate cortisol secretion from adult human adrenocortical cells". *Endocrinology*, 138(5): 2207-2210.
- Weinstein IB. (2002). "Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer". *Science*, 297(5578): 63-64.
- Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E and Spiegel AM. (1991). "Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome". *The New England journal of medicine*, 325(24): 1688-1695.
- Weiss LM. (1984). "Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors". *Am J Surg Pathol*, 8(3): 163-169.
- Weiss LM, Medeiros LJ and Vickery AL, Jr. (1989). "Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma". *Am J Surg Pathol*, 13(3): 202-206.
- Weitzman JB, Fiette L, Matsuo K and Yaniv M. (2000). "JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis". *Mol Cell*, 6(5): 1109-1119.
- Willert K and Jones KA. (2006). "Wnt signaling: is the party in the nucleus?" *Genes Dev*, 20(11): 1394-1404.
- Wolkersdorfer GW, Marx C, Brown J, Schroder S, Fussel M, Rieber EP, Kuhlisch E, Ehninger G and Bornstein SR. (2005). "Prevalence of HLA-DRB1 genotype and altered Fas/Fas ligand expression in adrenocortical carcinoma". *J Clin Endocrinol Metab*, 90(3): 1768-1774.
- Wolthuis RM and Bos JL. (1999). "Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral". *Curr Opin Genet Dev*, 9(1): 112-117.
- Xu M, Yu Q, Subrahmanyam R, Difilippantonio MJ, Ried T and Sen JM. (2008). "Beta-catenin expression results in p53-independent DNA damage and oncogene-induced senescence in prelymphomagenic thymocytes in vivo". *Mol Cell Biol*, 28(5): 1713-1723.
- Xu Y. (2003). "Regulation of p53 responses by post-translational modifications". *Cell death and differentiation*, 10(4): 400-403.

- Yang Y, Hu JF, Ulaner GA, Li T, Yao X, Vu TH and Hoffman AR. (2003). "Epigenetic regulation of Igf2/H19 imprinting at CTCF insulator binding sites". *J Cell Biochem*, 90(5): 1038-1055.
- Yano T, Linehan M, Anglard P, Lerman MI, Daniel LN, Stein CA, Robertson CN, LaRocca R and Zbar B. (1989). "Genetic changes in human adrenocortical carcinomas". *Journal of the National Cancer Institute*, 81(7): 518-523.
- Yashiro T, Hara H, Fulton NC, Obara T and Kaplan EL. (1994). "Point mutations of ras genes in human adrenal cortical tumors: absence in adrenocortical hyperplasia". *World journal of surgery*, 18(4): 455-460; discussion 460-451.
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A and Oren M. (1991). "Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6". *Nature*, 352(6333): 345-347.
- Yoon S and Seger R. (2006). "The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions". *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 24(1): 21-44.
- Yordy JS and Muise-Helmericks RC. (2000). "Signal transduction and the Ets family of transcription factors". *Oncogene*, 19(55): 6503-6513.
- Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T and Itakura M. (1993). "Rare mutations of the Gs alpha subunit gene in human endocrine tumors. Mutation detection by polymerase chain reaction-primer-introduced restriction analysis". *Cancer*, 72(4): 1386-1393.
- Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D and Moon RT. (1996). "The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3". *Genes Dev*, 10(12): 1443-1454.
- Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ and Boman BM. (2001). "Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer". *Cancer research*, 61(24): 8664-8667.
- Zhang Y and Tycko B. (1992). "Monoallelic expression of the human H19 gene". *Nat Genet*, 1(1): 40-44.
- Zhao J, Speel EJ, Muletta-Feurer S, Rutimann K, Saremaslani P, Roth J, Heitz PU and Komminoth P. (1999). "Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis". *Am J Pathol*, 155(4): 1039-1045.
- Zuber J, Tchernitsa OI, Hinzmann B, Schmitz AC, Grips M, Hellriegel M, Sers C, Rosenthal A and Schafer R. (2000). "A genome-wide survey of RAS transformation targets". *Nat Genet*, 24(2): 144-152.

## **RÉFÉRENCES INTERNET**

---



1. [http://www.curie.fr/home/presse/jic\\_article.cfm/lang/\\_fr/jic\\_article/246.htm](http://www.curie.fr/home/presse/jic_article.cfm/lang/_fr/jic_article/246.htm)
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=190020>
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=164790>
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=190070>
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=191170>
6. <http://p53.free.fr/>
7. <http://www-p53.iarc.fr/p53data-base.htm>
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=147470>
9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=116806>
10. <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>
11. <http://www.addgene.org/>
12. <http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/bovine.affx>





## **ANNEXE**

---



## **Insights into the Role of Genetic Alterations in Adrenocortical Tumorigenesis**

M. Herbet<sup>a,b</sup>, J.J. Feige<sup>a,b</sup> and M. Thomas<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 878, Grenoble, France

<sup>b</sup> Commissariat à l'Énergie Atomique, Institut de Recherches en Technologies et Sciences  
pour le Vivant, Grenoble, France

\*Corresponding author at: INSERM, U878, iRTSV-LAPV, CEA-G, 17 rue des Martyrs,  
38054 Grenoble, Cedex 09, France. Tel.: +33 1 438 78 44 64; fax: +33 1 438 78 50 58.

E-mail address: [michael.thomas@cea.fr](mailto:michael.thomas@cea.fr) (M. Thomas)

*In Press in Molecular and Cellular Endocrinology, 2009*

**Abstract**

Whereas benign adrenocortical tumors are frequent in the population, adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare cancer. Significant advances in the understanding of the pathogenesis of sporadic ACCs have been possible through the study of hereditary syndromes responsible for ACCs. The genetic alterations involved in these syndromes have also been found in sporadic ACCs. Several specific genes have been shown to be altered in sporadic ACCs. Despite these progresses, the underlying sequence(s) of events remains( ) to be elucidated. Progressive transformation of a normal tissue into a benign tumor and ultimately into a carcinoma occurs via accumulation of genetic and epigenetic alterations. Likewise, a multistage model has been proposed for the adrenal tumor development. This review summarizes the molecular alterations likely involved in the multistage tumorigenesis and describes a mouse model which allows us to evaluate the effect of individual genes or combination of genes in the development of adrenocortical tumors.

Keywords:

Adrenal cortex; Adenomas; Carcinomas; Multistage tumorigenesis; Xenotransplantation

## 1. Introduction

Cancer is a disorder at the cellular DNA level owing to the accumulation of multiple genetic changes resulting in the dysregulation/failure of genes that control cell cycle and cell proliferation. Some of the observed genetic alterations are widely shared among the different tumor types; however, the genetic analysis of cancers reveals a number of defined mutational events that appear specific for particular cancers, indicating that cancers follow certain evolutionary paths. Therefore, the comprehensive knowledge of a broad field of genetic alterations in a tumor type and the study of the correlation between these alterations and the resultant phenotype allow to better define the tumor classification and the understanding of the multistage carcinogenesis process. Finally, the comprehension of the signaling mechanisms and pathways that underlie the pathogenesis of cancer is critical to the development of more effective detection and therapeutic strategies.

The ability to recapitulate human cancer pathogenesis in a mouse model represents an important part of cancer research. The availability of athymic mice (*nu/nu*) and subsequent immunodeficient mouse strains with other genetic lesions such as severe combined immunodeficiency (*scid*) allowed the widespread possibility of studying human tumor explants and cell lines grown as xenotransplants. Xenografts are derived either from patient biopsies or from continuous cell lines. Biopsies have the advantage to retain the morphological and molecular marker properties reminiscent of the original tumors in humans. However, determining which specific oncogene and/or tumor suppressor gene mutations cooperate in tumor initiation and progression is an almost impossible challenge to take up. In contrast, cell lines from human tumors generally show a more homogeneous, undifferentiated histology indicative of a higher selection pressure *in vitro* during long-term growth in culture. Moreover, one needs to bear in mind that these cell lines have an undefined and complex mutational history from which it is often difficult to decipher the molecular events that lead to their creation and possibly, although not always, without resemblance to the human disease histology and architecture. Another important variable, which has to be considered when interpreting xenograft studies, is the site of tumor implantation. Most xenograft experiments use ectopic sites such as subcutaneous implantation where it is easy to inject tumor cells from culture or to transplant a small tumor mass and to assess tumor growth through the use of calipers to determine tumor volume. Several reports have shown differences in biological behavior such as ability to metastasize, response to antitumoral therapy when tumors are grown subcutaneously relative to orthotopically (Eccles et al., 1994).

Genetically engineered mouse models have been invaluable for the study of human cancer. Indeed, mice are inexpensive to keep, their generation is short, and they have in general large litters. The various mouse strains are highly inbred, providing uniform conditions in which experiments can be easily reproduced and statistical significance achieved. Currently, mouse modeling of human cancer is possible through the expression of oncogenes, specific genetic mutations, or the inactivation of tumor suppressor genes. However, mouse models may fail to faithfully mirror the human disease because the spontaneous occurrence of carcinoma in mice is rare. As they age, most laboratory mice will develop sarcomas and lymphomas while aged humans will develop carcinomas originating from the epithelial cells of various tissues (DePinho, 2000). Moreover, another fundamental difference between cancer development in humans and in transgenic mice is that, the genetic alteration, i.e. gain- or loss-of-function of a gene typically occurs in either all cells of the mouse or in all cells of a particular tissue, which contrasts with human cancer in which gene alterations are typically rare and stochastic.

## **2. Genetic Alterations in Sporadic Adrenocortical Tumors**

Sporadic adrenal carcinoma (ACC) is a rare endocrine neoplasm in humans, notorious for its aggressive behavior, metastatic potential and poor outcome with 5-yr survival ranging from 16 to 38 % (Allolio and Fassnacht, 2006; Kirschner, 2006). To date, radical surgery remains the mainstay of the curative modality put forward by clinicians for ACC patients (Kopf et al., 2001; Shen et al., 2005; Allolio and Fassnacht, 2006). Twenty percent of ACC patients with advanced disease cannot be cured by surgery (Crucitti et al., 1996; Icard et al., 2001) and the benefit of the medical treatment with mitotane (o,p'-dichlorodiphenyldichloroethane) is still questionable (Wooten and King, 1993; Latronico and Chrousos, 1997). By contrast, benign adrenocortical adenomas (ACAs) are common in the general population and are generally found incidentally (Grumbach et al., 2003). Whether adenoma represents a separate entity or is in fact part of a process of tumor progression leading to the emergence of an ACC is still an open question. The prevalence rate of cortical adenomas in a series of surgically resected incidental tumors is of 53% (Angeli et al., 1997) whereas the incidence for ACC is between 4 to 12 new cases per million in adults (Grumbach et al., 2003). From those numbers, it is clear that the frequency of adenomas is much higher than the frequency of ACC, which is consistent with the fact that only a very small fraction of adenomas will progress to cancer in patients. The development of tumors in other tissues, such as the colon is based on the accumulation of multiple genetic changes, resulting in

progression from benign to malignant diseases. Most adenomatous polyps of the colon, even though they are the precursors of invasive cancer, never actually progress to that stage (Vogelstein and Kinzler, 1993). This is consistent with the general concept of multistage tumorigenesis; the additional genetic change(s) that an adenoma needs to become a carcinoma is (are) infrequent. Thus, clinically, the occurrence of benign tumors is much more frequent than carcinomas.

Progress into the elucidation of the genes and pathways involved in the pathogenesis of sporadic ACC has been slow largely because of the rarity of this tumor. However, the study of two hereditary tumor syndromes associated with adrenal neoplasms has helped to unravel some genetic alterations.

### 2.1. The Li-Fraumeni syndrome

The patients affected by this autosomal dominant familial cancer syndrome have susceptibility to breast carcinoma, brain tumors, soft tissue sarcomas, leukemia and ACC (Hisada et al., 1998). The underlying genetic alteration is a germline mutation of TP53 located at 17p13. The TP53 gene is a tumor suppressor gene and is the most frequently mutated gene in human cancers (Hollstein et al., 1991). The p53 protein controls the cell cycle at the G1/S interface and plays an important role in inducing programmed cell death in response to severe cellular DNA damage (Vogelstein et al., 2000). Somatic mutations of TP53 are mostly located within exons 5-8 and are found in 20 to 33% of sporadic ACC whereas in sporadic ACAs the frequency rate is between 0 to 6 %, suggesting that genetic alterations in TP53 gene are rather involved late in the process of evolution towards malignancy (Ohgaki et al., 1993; Reincke et al., 1994; Libé et al., 2007). Loss of TP53 has at least three roles in progression: suppressing apoptosis, preventing cell cycle arrest and permitting genetic instability, which may be in favor of the generation of viable genetic variants (Shao et al., 2000).

### 2.2. The Beckwith-Wiedemann syndrome

This syndrome is an autosomal dominant familial disease characterized in affected patients by macroglossia, exomphalos, gigantism, and development of embryonic tumors such as Wilms' tumor, hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma, and ACC (Maher and Reik, 2000) (Hertel et al., 2003). The gene locus responsible for this syndrome was mapped to chromosome 11p15 (Henry et al., 1989), which includes the Insulin-like Growth Factor 2 (IGF-2), H19, and cyclin-dependent kinase inhibitor C (p57/kip2). This locus is subject to parental imprinting with IGF-2 solely expressed from the paternal allele, and H19 and



p57/kip2 normally expressed from the maternal allele. The pathogenesis of the Beckwith-Wiedemann syndrome has been ascribed to genetic and epigenetic changes in the 11p15 locus resulting in overexpression of IGF-2 and low expression of p57/kip2 and H19 (Lam et al., 1999). IGF-2 is predominantly expressed during embryonic development. In the actively growing fetal human adrenal gland, high levels of IGF-2 are detected whereas in adult adrenal tissue, only low IGF-2 levels are found. p57/kip2 is a cyclin-dependent kinase inhibitor and regulates cell cycle progression from the G1 to the S phase. H19 mRNA is not translated to protein and is hypothesized to regulate IGF-2 expression (Maher and Reik, 2000).

Genetic analysis of sporadic adrenocortical tumors for the 11p15 locus have shown that approximately 90% of ACCs and 8.5% of ACAs overexpressed IGF-2 (Ilvesmaki et al., 1993; Gicquel et al., 1994a, 1997, 2001), suggesting that whether IGF-2 plays a role in the pathogenesis of ACCs, it might be only in late stages of adrenocortical tumor development. Conversely, p57/kip2 and H19 mRNA expression are down-regulated in sporadic ACCs (Bourcigaux et al., 2000; Gicquel et al., 2001).

Several other genetic syndromes such as Carney complex, Multiple Endocrine Neoplasia type 1 and McCune-Albright syndrome are associated with the development of ACCs. However, the involvement of the specific genetic defect at the origin of these diseases in the pathogenesis of sporadic ACCs has not been clearly established (Schulte et al., 2000; Bertherat et al., 2003) or might play only a minor role in malignant ACC tumor growth.

### 2.3. Specific genetic alterations in sporadic adrenocortical tumors

The multistage model of tumorigenesis emphasizes somatic mutations as the initiating event leading to the formation of preneoplastic lesion, which then is followed by the accumulation of additional genetic and epigenetic changes in the initiated cells or its progeny. One can hypothesize that preneoplastic lesion could represent an ACA which may become an ACC through the acquisition of new alterations. If the adenoma-to-carcinoma concept is applicable to the adrenal cortex, then common genetic alterations should be found in both ACAs and ACCs as well. Two clinical cases (Bernard et al., 2003; Gaujoux et al., 2008) describing an ACT with a benign and a malignant part are consistent with this concept. The identification of genetic alterations known to be associated with familial cancer syndromes as those discussed above, in sporadic ACCs was of great help in unraveling the genetic lesions involved mostly in progression. Initiation of benign adrenocortical tumors remains a mystery although there are specific genetic alterations occurring in sporadic benign and malignant tumors.

The Ras gene family is composed of three genes (H-, K- and N-Ras) and encodes low molecular weight GTPases which cycle between the GDP-bound (inactive) and GTP-bound (active) state at the plasma membrane. These molecular switches are involved in signaling pathways that modulate proliferation, differentiation, motility and death (Shields et al., 2000). Due to its pivotal roles, it is not surprising that Ras genes are the most frequently mutated oncogenes in human cancer (Bos, 1989). Activating N-Ras mutations were identified in 12.5% of ACCs and ACAs tested whereas no mutations were found in K- and H-Ras (Yashiro et al., 1994). In a smaller number of tumors, Moul *et al.* (1993) did not detect any point mutations in N-, H- or K-Ras. Finally, Ocker *et al.* (2000) also did not identify K-Ras mutations in 40 AAs. It is interesting to note that Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is overexpressed in ACAs as well as in ACCs (Kamio et al., 1990; Sasano et al., 1994). Moreover, as the signal transducing tyrosine kinase activity of the EGFR is mediated by Ras proteins among others, it is conceivable that chronically active wild type Ras promotes tumorigenesis through activation of multiple Ras effectors that contribute to deregulated cell growth, dedifferentiation, and increased survival, migration and invasion. EGF is not overexpressed in ACCs, but the receptor may be bound by TGF $\alpha$ , which is a natural ligand for EGFR and is often found in adrenal tumors (Sasano et al., 1994).

Signaling by the Wnt family of secreted lipoproteins has central roles in embryogenesis and in adult tissue homeostatic processes. The central event in the canonical Wnt pathway is the stabilization of the transcription cofactor  $\beta$ -catenin in the cytoplasm and following its nuclear translocation and interaction with T-cell factor/lymphoid enhancer factor,  $\beta$ -catenin-dependent gene expression (Clevers, 2006).  $\beta$ -catenin has also a function in cell-cell adhesion by interacting with E-cadherin and  $\alpha$ -catenin. Activating mutations of the Wnt signaling pathway have been described in a large number of sporadic tumors (Giles et al., 2003). Activating mutations of exon 3 of the  $\beta$ -catenin gene (CTNNB1) were found with similar frequencies in ACAs and ACCs whereas abnormal immunolocalization of  $\beta$ -catenin was observed at a higher rate in ACAs than in ACCs (Tissier et al., 2005). This discrepancy could be explained by mutations in other components involved in the Wnt signaling pathway, which may participate in the progression of ACCs towards a more aggressive phenotype. A recent study found similar results as concerns mutation rate in ACAs however, due to the very small number of ACCs included, no mutations in the  $\beta$ -catenin gene were found (Tadjine et al., 2008). The identification of  $\beta$ -catenin mutations in hepatocellular adenomas was correlated to a higher risk of malignant transformation in hepatocellular carcinoma (Zucman-Rossi et al.,

2006). Thus, it is possible that  $\beta$ -catenin mutation may be part of the multistage model of tumorigenesis.

Angiogenesis is a pivotal step in the progression of a variety of solid tumors (Folkman, 1992). The angiogenic profile of ACTs may be assessed by the analysis of angiogenic factors such as Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) expression. ACCs appeared to have a higher angiogenic potential as compared to ACAs because of an increase in VEGF expression (de Fraipont et al., 2000; Bernini et al., 2002). This overexpression in ACCs endows the tumor with the capability to synthesize new blood vessels and therefore to induce tumor growth towards malignancy and metastasis. VEGF levels, although difficult to measure in serum due to its abundance in platelets, were reported to be significantly higher in sera of patients with ACCs than of patients with ACAs (Kolomecki et al., 2001).

#### 2.4. Clonal composition of adrenocortical tumors

Specific molecular events underlying the initiation of human adrenocortical tumor formation are poorly understood; however, results of several studies suggest that adenomas and carcinomas arise after somatic mutational events. In particular, clonal composition of ACTs tumors has been determined by the patterns of X-chromosome inactivation in females heterozygous for X-linked polymorphisms. From the three studies carried out thus far, one may conclude that ACCs are more often monoclonal whereas ACAs may be either polyclonal or monoclonal (Beuschlein et al., 1994; Gicquel et al., 1994b; Blanes and Diaz-Cano, 2006). The genetic heterogeneity evidenced in ACAs may be explained either by different pathological mechanisms or, by different stages of a common multistep process. Thus, a somatic mutational event causes one or a small number of adrenocortical cells to initiate the neoplastic process by polyclonal expansion (Nowell, 1976). Subsequent somatic mutations result in additional rounds of clonal expansion towards selection of subclone with an increase in its survival and/or proliferative potential, which will tend to spread in the neoplasm to the detriment of competitor clones and normal cells that lack the beneficial mutation.

### 3. Contribution of cell transplantation studies to deciphering multistage tumorigenesis in adrenal cortex

Through advances in the molecular analysis of human adrenocortical adenomas and carcinomas as discussed before, several well-defined and sometimes common molecular pathways have been found to be dysregulated. However, the progress into the elucidation of the mechanisms of adrenal tumorigenesis with a stepwise progression from AACs to ACCs has been slow in particular because of the rarity of the ACCs. The lack of a suitable animal model is another obstacle for unraveling the role of a given genetic alteration and its possible cooperation with other gene defect in the pathogenesis of the disease. Recapitulating the various stages of tumor progression of human cells within a mouse may be an important approach to understanding the potential behavior of individual premalignant adrenal lesions and to developing rational medical strategies for their management to halt their progression to invasive cancer.

In order to tackle this issue, we used an *in vivo* model of cell transplantation and tissue reconstruction (Thomas et al., 1997; Thomas and Hornsby, 1999). Since orthotopic adrenal cell implantation in mice is technically very challenging, we have developed a model where normal primary bovine or human adrenocortical cells are transplanted under the kidney capsule of adrenalectomized scid mice (Fig. 1). Once implanted in that space, the cells rapidly reconstitute a vascularized and functional tissue, which secretes cortisol and avoids the otherwise lethal effect of adrenalectomy (Thomas and Hornsby, 1999; Thomas et al., 2002b). The tissues formed are chimeric, composed of human or bovine adrenal cells together with mouse cells (endothelial cells lining the capillaries and stromal cells). Tissue reconstruction models differ from conventional assays in immunodeficient mice (subcutaneous or intramuscular injection of cell suspension) in that the cell survival is not severely compromised by the implantation technique. If the cell survival is low, as it is in conventional assays, an undesired selection advantage might take place among the cells that would lead them to acquire a molecular phenotype different from the one of the general cell population. The fact that clonal bovine adrenocortical cells could form a functional tissue following transplantation (Thomas et al., 1997) prompted us to genetically modify the cells prior transplantation. When genetically modified cells are used during transplantation procedures, they form what may be termed a transgenic tissue (Thomas et al., 2000, 2002a; Mazzuco et al., 2006a,b). The power of germline genetic modification in the mouse to answer important biological questions is well established. For human cells, genetic modification in cell culture has been similarly

powerful in elucidating human gene function. However, although germ line modification of humans is not an acceptable option, studying transgenic tissues containing human cells within experimental animals is acceptable and could prove useful to study how human genes function in such tissues *in vivo*. The ability of cell transplantation to create tissues expressing specific genes and gene combinations enables greater insight into the mode by which a protein by itself or in combination cooperates in benign or malignant transformation.

The rationale for the use of bovine cells is mainly due to the low availability of human cells. However, like human cells, bovine cells do not have telomerase activity sufficient for telomere maintenance and therefore undergo telomere shortening, leading to senescence (Thomas et al., 2000). Like human cells, they maintain a stable karyotype under long-term growth in culture. However, they have substantially longer telomeres than human cells (Kozik et al., 1998), enabling greater cell proliferation in the absence of telomerase, both in cell culture and in tissues formed from transplanted cells.

In the first set of experiments that used genetically modified cells, we showed that bovine adrenocortical cells immortalized by the introduction of hTERT (telomerase reverse transcriptase) formed a functional tissue in mice that closely resemble that formed from non-genetically modified cells (Thomas et al., 2000). The tissue formed from the transplanted cells maintained normal growth control. Clearly, enforced telomerase activity in normal adrenocortical cells is not sufficient for transformation and may be a late event in tumor progression as several reports have documented an increase in telomerase activity in ACCs in comparison to ACAs (Hirano et al., 1998; Mannelli et al., 2000; Else et al., 2008). In subsequent experiments, we showed that bovine adrenocortical cells modified with three genetic changes (hTERT, SV40 large T antigen (SV40 TAg), and oncogenic Ras<sup>G12V</sup>) were tumorigenic (Thomas et al., 2002a) (Fig.1). Mutation at codon 12 in H-Ras impairs its intrinsic GTPase activity and confers insensitivity to cytosolic GTPase-activating proteins, thereby locking the enzyme into an active H-Ras-GTP conformation for signaling through a variety of effector pathways (Shields et al., 2000). Since SV40 large T oncoproteins bind and inactivate the pRB and p53 tumor suppressor proteins, we concluded that at least the combination of hTERT with mutation in one oncogene and ablation of two tumor suppressor genes is sufficient to fully transform normal adrenocortical cells. Taking advantage of our model of cell transplantation, we were able to study the phenotype of the tissue formed after the transduction of different combinations of our genes. The tissue formed following hTERT and SV40 TAg or SV40 TAg alone is abnormal, yet not tumorigenic. These tissues had a high proliferation rate and a high rate of cell death. Cells expressing oncogenic Ras produced

a functional tissue constituted of both clear, lipid-laden cells and eosinophilic lipid-depleted cells with an irregular architecture, cellular pleiomorphism and nuclear atypia. Later on, it has been shown that SV40 TAg and Ras without hTERT were capable of the conversion of both bovine and human adrenocortical cells into malignant cells (Sun et al., 2004).

#### **4. Conclusion**

While we believe these experiments are of interest in the context of a multistage model of tumorigenesis, they are also significant in that they provide a proof of principle that the formation of genetically modified tissues by transplantation of adrenocortical cells is feasible. When extended to human carcinoma development, we realized that the SV40 large T antigen expression is obviously not involved in human adrenal tumorigenesis, however this proof of principle let us envision that the experimental model is suitable for checking the transforming potential of genes of interest in tissues and for recapitulating human adrenal tumor initiation and progression. Furthermore, as described above, the model is designed for the evaluation of multiple genetic alterations, individually and in combination thus increasing the ability to mimic the wide spectrum of human ACTs. Studies are underway to assess the genetic alterations observed in human ACTs in our multistage tumorigenesis animal model. Finally, the model should allow further progress in enhancing our understanding into the molecular and cellular mechanisms that underlie the pathogenesis of ACC.

**Acknowledgments**

This work was supported by INSERM, CEA (DSV/iRTSV/LAPV U878), Fondation de France (research grant 2004012837 to M.T.) and Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Grant AOM 02068) to the COMETE Network.

## References

- Allolio, B. and Fassnacht, M., 2006. Adrenocortical Carcinoma: Clinical Update. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 2027-2037.
- Angeli, A., Osella, G., Ali, A. and Terzolo, M., 1997. Adrenal incidentaloma: an overview of clinical and epidemiological data from the National Italian Study Group. *Horm Res.* 47, 279-283.
- Bernard, M.H., Sidhu, S., Berger, N., Peix, J.L., Marsh, D.J., Robinson, B.G., Gaston, V., Le Bouc, Y. and Gicquel, C., 2003. A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 998-1001.
- Bernini, G.P., Moretti, A., Bonadio, A.G., Menicagli, M., Viacava, P., Naccarato, A.G., Iacconi, P., Miccoli, P. and Salvetti, A., 2002. Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 4961-4965.
- Bertherat, J., Groussin, L., Sandrini, F., Matyakhina, L., Bei, T., Stergiopoulos, S., Papageorgiou, T., Bourdeau, I., Kirschner, L.S., Vincent-Dejean, C., Perlemoine, K., Gicquel, C., Bertagna, X. and Stratakis, C.A., 2003. Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Res.* 63, 5308-5319.
- Beuschlein, F., Reincke, M., Karl, M., Travis, W.D., Jaurisch-Hancke, C., Abdelhamid, S., Chrousos, G.P. and Allolio, B., 1994. Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res.* 54, 4927-4932.
- Blanes, A. and Diaz-Cano, S.J., 2006. DNA and kinetic heterogeneity during the clonal evolution of adrenocortical proliferative lesions. *Hum Pathol.* 37, 1295-1303.
- Bos, J.L., 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682-4689.
- Bourcigaux, N., Gaston, V., Logie, A., Bertagna, X., Le Bouc, Y. and Gicquel, C., 2000. High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 322-330.
- Clevers, H., 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 127, 469-480.
- Crucitti, F., Bellantone, R., Ferrante, A., Boscherini, M. and Crucitti, P., 1996. The Italian Registry for Adrenal Cortical Carcinoma: analysis of a multiinstitutional series of 129 patients. The ACC Italian Registry Study Group. *Surgery.* 119, 161-170.
- de Fraipont, F., El Atifi, M., Gicquel, C., Bertagna, X., Chambaz, E.M. and Feige, J.J., 2000. Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 4734-4741.



- DePinho, R.A., 2000. The age of cancer. *Nature*. 408, 248-254.
- Eccles, S.A., Box, G., Court, W., Sandle, J. and Dean, C.J., 1994. Preclinical models for the evaluation of targeted therapies of metastatic disease. *Cell Biophys*. 24-25, 279-291.
- Else, T., Giordano, T.J. and Hammer, G.D., 2008. Evaluation of telomere length maintenance mechanisms in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 93, 1442-1449.
- Folkman, J., 1992. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol*. 3, 65-71.
- Gaujoux, S., Tissier, F., Groussin, L., Libé, R., Ragazzon, B., Launay, P., Audebourg, A., Dousset, B., Bertagna, X. and Bertherat, J., 2008. Wnt/ss-catenin and cAMP/PKA signaling pathways alterations and somatic ss-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, in press.
- Gicquel, C., Bertagna, X., Gaston, V., Coste, J., Louvel, A., Baudin, E., Bertherat, J., Chapuis, Y., Duclos, J.M., Schlumberger, M., Plouin, P.F., Luton, J.P. and Le Bouc, Y., 2001. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 61, 6762-6767.
- Gicquel, C., Bertagna, X., Schneid, H., Francillard-Leblond, M., Luton, J.P., Girard, F. and Le Bouc, Y., 1994a. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 78, 1444-1453.
- Gicquel, C., Leblond-Francillard, M., Bertagna, X., Louvel, A., Chapuis, Y., Luton, J.P., Girard, F. and Le Bouc, Y., 1994b. Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 40, 465-477.
- Gicquel, C., Raffin-Sanson, M.L., Gaston, V., Bertagna, X., Plouin, P.F., Schlumberger, M., Louvel, A., Luton, J.P. and Le Bouc, Y., 1997. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 82, 2559-2565.
- Giles, R.H., van Es, J.H. and Clevers, H., 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1653, 1-24.
- Grumbach, M.M., Biller, B.M., Braunstein, G.D., Campbell, K.K., Carney, J.A., Godley, P.A., Harris, E.L., Lee, J.K., Oertel, Y.C., Posner, M.C., Schlechte, J.A. and Wieand, H.S., 2003. Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). *Ann Intern Med*. 138, 424-429.
- Henry, I., Jeanpierre, M., Couillin, P., Barichard, F., Serre, J.L., Journal, H., Lamouroux, A., Turleau, C., de Grouchy, J. and Junien, C., 1989. Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition to adrenocortical carcinoma. *Hum Genet*. 81, 273-277.
- Hertel, N.T., Carlsen, N., Kerndrup, G., Pedersen, I.L., Clausen, N., Hahnemann, J.M. and Jacobsen, B.B., 2003. Late relapse of adrenocortical carcinoma in Beckwith-Wiedemann syndrome. Clinical, endocrinological and genetic aspects. *Acta Paediatr*. 92, 439-443.

- Hirano, Y., Fujita, K., Suzuki, K., Ushiyama, T., Ohtawara, Y. and Tsuda, F., 1998. Telomerase activity as an indicator of potentially malignant adrenal tumors. *Cancer*. 83, 772-776.
- Hisada, M., Garber, J.E., Fung, C.Y., Fraumeni, J.F., Jr. and Li, F.P., 1998. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 90, 606-611.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C., 1991. p53 mutations in human cancers. *Science*. 253, 49-53.
- Icard, P., Goudet, P., Charpenay, C., Andreassian, B., Carnaille, B., Chapuis, Y., Cougard, P., Henry, J.F. and Proye, C., 2001. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg*. 25, 891-897.
- Ilvesmaki, V., Kahri, A.I., Miettinen, P.J. and Voutilainen, R., 1993. Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 77, 852-858.
- Kamio, T., Shigematsu, K., Sou, H., Kawai, K. and Tsuchiyama, H., 1990. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma. *Hum Pathol*. 21, 277-282.
- Kirschner, L.S., 2006. Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope. *J Clin Endocrinol Metab*. 91, 14-21.
- Kolomecki, K., Stepien, H., Bartos, M. and Kuzdak, K., 2001. Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours. *Endocr Regul*. 35, 9-16.
- Kopf, D., Goretzki, P.E. and Lehnert, H., 2001. Clinical management of malignant adrenal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 127, 143-155.
- Kozik, A., Bradbury, E.M. and Zalensky, A., 1998. Increased telomere size in sperm cells of mammals with long terminal (TTAGGG)<sub>n</sub> arrays. *Mol Reprod Dev*. 51, 98-104.
- Lam, W.W., Hatada, I., Ohishi, S., Mukai, T., Joyce, J.A., Cole, T.R., Donnai, D., Reik, W., Schofield, P.N. and Maher, E.R., 1999. Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation. *J Med Genet*. 36, 518-523.
- Latronico, A.C. and Chrousos, G.P., 1997. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 82, 1317-1324.
- Libé, R., Groussin, L., Tissier, F., Elie, C., Rene-Corail, F., Fratticci, A., Jullian, E., Beck-Peccoz, P., Bertagna, X., Gicquel, C. and Bertherat, J., 2007. Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin Cancer Res*. 13, 844-850.
- Maher, E.R. and Reik, W., 2000. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest*. 105, 247-252.

- Mannelli, M., Gelmini, S., Arnaldi, G., Becherini, L., Bemporad, D., Crescioli, C., Pazzagli, M., Mantero, F., Serio, M. and Orlando, C., 2000. Telomerase activity is significantly enhanced in malignant adrenocortical tumors in comparison to benign adrenocortical adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 468-470.
- Mazzuco, T.L., Chabre, O., Feige, J.J. and Thomas, M., 2006a. Aberrant expression of human luteinizing hormone receptor by adrenocortical cells is sufficient to provoke both hyperplasia and Cushing's syndrome features. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 196-203.
- Mazzuco, T.L., Chabre, O., Sturm, N., Feige, J.J. and Thomas, M., 2006b. Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. *Endocrinology.* 147, 782-790.
- Moul, J.W., Bishoff, J.T., Theune, S.M. and Chang, E.H., 1993. Absent ras gene mutations in human adrenal cortical neoplasms and pheochromocytomas. *J Urol.* 149, 1389-1394.
- Nowell, P.C., 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194, 23-28.
- Ocker, M., Sachse, R., Rico, A. and Hensen, J., 2000. PCR-SSCP analysis of human adrenocortical adenomas: absence of K-ras gene mutations. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 108, 513-514.
- Ohgaki, H., Kleihues, P. and Heitz, P.U., 1993. p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer.* 54, 408-410.
- Reinke, M., Karl, M., Travis, W.H., Mastorakos, G., Allolio, B., Linehan, H.M. and Chrousos, G.P., 1994. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 78, 790-794.
- Sasano, H., Suzuki, T., Shizawa, S., Kato, K. and Nagura, H., 1994. Transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor expression in normal and diseased human adrenal cortex by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Mod Pathol.* 7, 741-746.
- Schulte, K.M., Heinze, M., Mengel, M., Scheuring, S., Kohrer, K. and Roher, H.D., 2000. Complete sequencing and mRNA expression analysis of the MEN-I gene in adrenal myelolipoma. *Horm Metab Res.* 32, 169-173.
- Shao, C., Deng, L., Henegariu, O., Liang, L., Stambrook, P.J. and Tischfield, J.A., 2000. Chromosome instability contributes to loss of heterozygosity in mice lacking p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 7405-7410.
- Shen, W.T., Sturgeon, C. and Duh, Q.Y., 2005. From incidentaloma to adrenocortical carcinoma: the surgical management of adrenal tumors. *J Surg Oncol.* 89, 186-192.
- Shields, J.M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A. and Der, C.J., 2000. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol.* 10, 147-154.

- Sun, B., Huang, Q., Liu, S., Chen, M., Hawks, C.L., Wang, L., Zhang, C. and Hornsby, P.J., 2004. Progressive loss of malignant behavior in telomerase-negative tumorigenic adrenocortical cells and restoration of tumorigenicity by human telomerase reverse transcriptase. *Cancer Res.* 64, 6144-6151.
- Tadjine, M., Lampron, A., Ouadi, L., Horvath, A., Stratakis, C.A. and Bourdeau, I., 2008. Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*.
- Thomas, M., Northrup, S.R. and Hornsby, P.J., 1997. Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands. *Nat Med.* 3, 978-983.
- Thomas, M. and Hornsby, P.J., 1999. Transplantation of primary bovine adrenocortical cells into scid mice. *Mol Cell Endocrinol.* 153, 125-136.
- Thomas, M., Suwa, T., Yang, L., Zhao, L., Hawks, C.L. and Hornsby, P.J., 2002. Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis: a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells. *Neoplasia.* 4, 493-500.
- Thomas, M., Yang, L. and Hornsby, P.J., 2000. Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase. *Nat Biotechnol.* 18, 39-42.
- Tissier, F., Cavard, C., Groussin, L., Perlemoine, K., Fumey, G., Hagnere, A.M., Rene-Corail, F., Jullian, E., Gicquel, C., Bertagna, X., Vacher-Lavenu, M.C., Perret, C. and Bertherat, J., 2005. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 65, 7622-7627.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W., 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9, 138-141.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature.* 408, 307-310.
- Wooten, M.D. and King, D.K., 1993. Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. *Cancer.* 72, 3145-3155.
- Yashiro, T., Hara, H., Fulton, N.C., Obara, T. and Kaplan, E.L., 1994. Point mutations of ras genes in human adrenal cortical tumors: absence in adrenocortical hyperplasia. *World J Surg.* 18, 455-460; discussion 460-451.
- Zucman-Rossi, J., Jeannot, E., Nhieu, J.T., Scoazec, J.Y., Guettier, C., Rebouissou, S., Bacq, Y., Leteurtre, E., Paradis, V., Michalak, S., Wendum, D., Chiche, L., Fabre, M., Mellottee, L., Laurent, C., Partensky, C., Castaing, D., Zafrani, E.S., Laurent-Puig, P., Balabaud, C. and Bioulac-Sage, P., 2006. Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology.* 43, 515-524.

**Figure legend**

**Figure 1:** Schematic representation of experimental transplantation of adrenocortical cells. At the time of surgery, the genetically engineered cells are harvested and counted. Each recipient mouse with the scid (severe combined immunodeficiency) mutation is adrenalectomized and the kidney on the left side is exteriorized. Then,  $2 \times 10^6$  cells are transplanted beneath the kidney capsule through a transrenal injection with a 50  $\mu$ l Hamilton syringe fitted with a blunt needle. When the animals are killed, tumoral tissue is readily visible with prominent blood vessels.

**Figure 1**